

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
14 novembre 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 02/090319 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C07C 245/14, 245/18, C07D  
209/14, 495/04, 311/82, C12Q 1/68

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/01543

(22) Date de dépôt international : 3 mai 2002 (03.05.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/06040 4 mai 2001 (04.05.2001) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : BIO  
MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy

L'Etoile (FR). UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
(GRENOBLE 1) [FR/FR]; Domaine Universitaire St  
Martin d'Hères, F-38041 Grenoble (FR). CENTRE  
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
[FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16  
(FR).

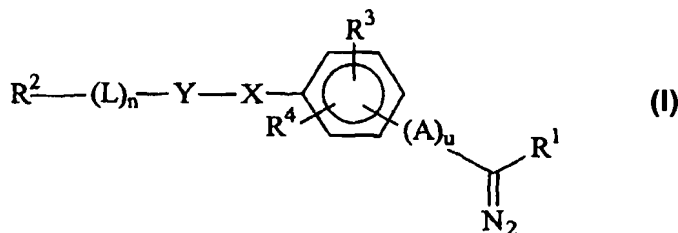
(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BOUR-  
GET, Cécile [FR/FR]; 3, chemin Villebois, F-38100  
Grenoble (FR). LHOMME, Jean [FR/FR]; 13, allée  
des Brandons, F-38240 Meylan (FR). LAAYOUN, Ali  
[FR/FR]; 70, rue Challemel Lacour, F-69007 Lyon (FR).  
KOTERA, Mitsuharu [FR/FR]; 20, rue des Peupli-  
ers, F-38240 Meylan (FR). TREVISIOL, Emmanuelle  
[FR/FR]; 16, vieux chemin de Blagnac, F-31700 Cornebar-  
rieu (FR). MENU, Lionel [FR/FR]; 8, chemin de la

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: LABELLING REAGENTS, METHOD FOR SYNTHESIS OF SAID REAGENTS AND METHODS FOR DETECT-  
ING BIOLOGICAL MOLECULES

(54) Titre : REACTIFS DE MARQUAGE, PROCEDES DE SYNTHESE DE TELS REACTIFS ET PROCEDES DE DETECTION  
DE MOLECULES BIOLOGIQUES



(57) Abstract: The invention concerns a temperature-stable labelling reagent of formula (I), wherein: R<sup>1</sup> represents H or an alkyl, aryl or substituted aryl group; R<sup>2</sup> represents a detectable marker or at least two detectable markers linked together by at least a multi-meric structure; L is a linking arm comprising a linear catemer concatenation of at least two covalent bonds; and n is an integer equal to 0 or 1; R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> represent, independently of each other: H, NO<sub>2</sub>, Cl, Br, F, I, R<sup>2</sup>-(L)<sub>n</sub>-Y-X-, OR, SR, NR<sub>2</sub>, R, NHCOR, CONHR, COOR with R = alkyl or aryl, A is a linking arm comprising at least a double bond enabling the conjugation of the diazo function with the aromatic cycle; and u is a whole number between 0 and 2, preferably between 0 and 1; and -Y-X- represents -CONH-, -NHCO-, -CH<sub>2</sub>O-, -CH<sub>2</sub>S-. The invention also concerns a method for the synthesis of said markers and uses for labelling biological molecules, in particular nucleic acids, with a labelling reagent bearing the diazomethyl function. The invention is particularly applicable in the field of diagnosis.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un réactif de marquage stable à la température de formule (I), dans laquelle: R<sup>1</sup> représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué, R<sup>2</sup> représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique, L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1, R<sup>3</sup> et R<sup>4</sup> représentent indépendamment l'un de l'autre: H, NO<sub>2</sub>, Cl, Br, F, I, R<sup>2</sup>-(L)<sub>n</sub>-Y-X-, OR, SR, NR<sub>2</sub>, R, NHCOR, CONHR, COOR avec R = alkyle ou aryle, A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u est un nombre entier compris entre 0 et 2, préférentiellement de 0 ou 1, et -Y-X- représente -CONH-, -NHCO-, -CH<sub>2</sub>O-, -CH<sub>2</sub>S-. La présente invention décrit aussi un procédé de synthèse desdits marqueurs ainsi que des applications pour le marquage de molécules biologiques, en particulier des acides nucléiques, avec un réactif de marquage portant la fonction diazométhyle. L'invention trouve une application préférentielle dans le domaine du diagnostic.

WO 02/090319 A1



Tassin, F-69230 Saint Genis Laval (FR). **BERNAL MENDEZ, Eloy** [ES/FR]; 9, cours Gambetta, F-69003 Lyon (FR).

(74) **Mandataire : CABINET GERMAIN & MAUREAU;**  
12, rue Boileau, F-69006 Lyon (FR).

(81) **États désignés (national) :** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **États désignés (régional) :** brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

— avec rapport de recherche internationale

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

« REACTIFS DE MARQUAGE, PROCEDES DE SYNTHESE DE TELS REACTIFS ET  
PROCEDES DE DETECTION DE MOLECULES BIOLOGIQUES »

La présente invention concerne de nouveaux réactifs de marquage de molécules  
5 biologiques, un procédé de synthèse desdits marqueurs ainsi que des applications pour le  
marquage de molécules biologiques en particulier dans le domaine du diagnostic par sondes  
nucléiques.

L'état de la technique montre que de nombreuses méthodes existent pour marquer des  
nucléotides, des oligonucléotides ou des acides nucléiques.

10 Une première méthode consiste à fixer le marqueur sur la base, que celle-ci soit  
naturelle ou modifiée. Une deuxième méthode propose de fixer le marqueur sur le sucre, là  
encore qu'il soit naturel ou modifié. Une troisième méthode a pour objet la fixation du  
marqueur sur le phosphate.

Le marquage sur la base a été notamment utilisé dans l'approche de marquage des  
15 acides nucléiques par incorporation de nucléotides directement marqués.

Le marquage sur le sucre est souvent utilisé dans le cas des sondes nucléiques  
préparées par synthèse chimique.

Le marquage sur le phosphate a été aussi utilisé pour introduire des bras  
fonctionnalisés et des marqueurs lors de la synthèse chimique des oligonucléotides.

20

En fait l'homme du métier, qui doit effectuer un marquage d'un nucléotide, ou d'un  
analogue de nucléotide ou d'un acide nucléique, est enclin à effectuer cette fixation sur la base  
ou sur le sucre qui lui offrent plus de commodité et d'alternatives. C'est d'ailleurs ce qui  
ressort de l'étude de nombreux documents, tels que EP-A-0.329.198, EP-A-0.302.175, EP-A-  
25 0.097.373, EP-A-0.063.879, US-A-5,449,767, US-A-5,328,824, WO-A-93/16094, DE-A-  
3.910.151, EP-A-0.567.841 pour la base ou EP-A-0.286.898 pour le sucre.

La fixation du marqueur sur le phosphate est une technique plus complexe que la  
technique consistant à fonctionnaliser la base ou le sucre et a été bien moins utilisée  
30 notamment à cause de la faible réactivité du phosphate (voir par exemple Jencks W.P. et al J.  
Amer. Chem Soc., 82, 1778-1785, 1960). De même dans la revue de O'Donnel et Mc

Laughlin (« Reporter groups for the analysis of nucleic acid structure », p 216-243, dans « Bioorganic Chemistry : Nucleic Acids », Ed Hecht S.M., Oxford University Press, 1996) portant sur les méthodes d'introduction de sondes dans les fragments d'oligonucléotides, l'alkylation efficace du phosphodiester internucléotidique est considérée comme étant impossible.

La demande de brevet WO-A-99/65926 décrit un procédé de marquage d'un acide ribonucléique (ARN) de synthèse ou naturel qui consiste à fragmenter l'ARN et à marquer au niveau du phosphate terminal. Ce document décrit un certain nombre de fonctions pouvant être utilisées pour le marquage en liaison avec la fragmentation comme les fonctions hydroxyle, amine, hydrazine, alcoxyamine, halogénure d'alkyle, halogénure d'alkyle de type benzylique et en particulier le dérivé 5-(bromométhyl)fluorescéine. Ces fonctions permettent de marquer les acides nucléiques, mais il faut associer une étape de fragmentation pour avoir un marquage efficace car ce marquage se produit sur le phosphate libéré lors de la fragmentation. De plus, il faut ajouter un excès important de réactif de marquage par rapport à l'ARN pour obtenir un marquage efficace ce qui induit des problèmes de bruit de fond générés par le marqueur en excès. Enfin, cette méthode ne fonctionne pas efficacement sur de l'ADN double brin.

Il existe donc un besoin pour de nouveaux réactifs qui soient efficaces du point de vue du rendement de marquage, qui soient spécifiques au niveau de la position de marquage et en particulier qui n'affectent pas les propriétés d'hybridation des bases impliquées dans la formation de la double hélice, par l'intermédiaire des liaisons hydrogènes, qui soient utilisables à la fois pour l'ADN et l'ARN, et enfin qui permettent de marquer indifféremment des nucléotides, des oligonucléotides, des acides nucléiques naturels ou préparés par amplification enzymatique.

La présente invention décrit de nouveaux marqueurs qui répondent aux conditions précitées et qui utilisent la fonction diazométhyle comme fonction réactive pour le marquage.

La fonction diazométhyle (de formule  $-C(N_2)-$ ) a déjà été utilisée pour l'alkylation des groupements phosphates, mais un certain nombre de problèmes se posent. D'une part, les

dérivés diazo en général sont instables eux-mêmes, ce qui pose des problèmes pour l'utilisation des ces réactifs de marquage dans un kit de marquage, et d'autre part, le produit de couplage est instable ce qui est rédhibitoire si le produit marqué a pour fonction de mettre en évidence la présence d'une molécule cible biologique dans un échantillon quelconque.

5

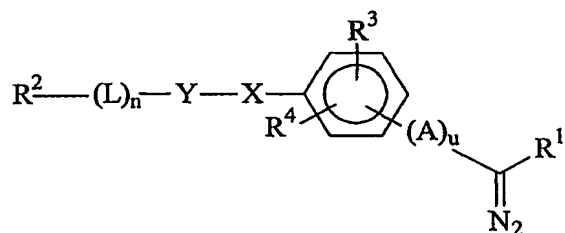
Enfin les dérivés portant la fonction diazométhyle sont insolubles dans l'eau, ce qui conduit à utiliser des conditions biphasiques pour le couplage avec des molécules biologiques, qui ne sont solubles et stables que dans l'eau ou des tampons aqueux, mais ces conditions ralentissent la vitesse de réaction et donc nuisent à l'efficacité du couplage.

10

Les nouveaux réactifs de marquage de l'invention résolvent aussi ces problèmes techniques.

Selon un premier mode de réalisation, la présente invention décrit un réactif de marquage stable à la température de formule (0) :

15



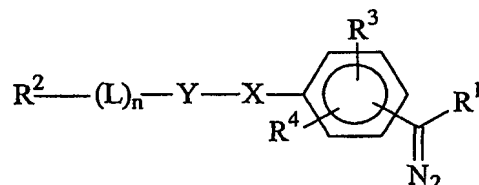
dans laquelle :

- $\text{R}^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- $\text{R}^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- $\text{R}^3$  et  $\text{R}^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $\text{R}^2 - (\text{L})_n - \text{Y} - \text{X}$ -, OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u est un nombre entier compris entre 0 et 2, préférentiellement de 0 ou 1, et

25

- -Y-X- représente -CONH-, -NHCO-, -CH<sub>2</sub>O-, -CH<sub>2</sub>S-.

Selon un deuxième mode de réalisation, la présente invention décrit un réactif de marquage stable à la température de formule (1) :



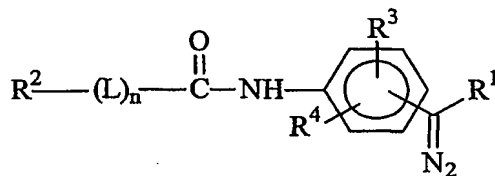
5

dans laquelle :

- R<sup>1</sup> représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- R<sup>2</sup> représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- 10 • L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- R<sup>3</sup> et R<sup>4</sup> représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO<sub>2</sub>, Cl, Br, F, I, R<sup>2</sup>-(L)<sub>n</sub>-Y-X-, OR, SR, NR<sub>2</sub>, R, NHCOR, CONHR, COOR avec R = alkyle ou aryle, et
- -Y-X- représente -CONH-, -NHCO-, -CH<sub>2</sub>O-, -CH<sub>2</sub>S-.

15

Avantageusement, selon une première variante du deuxième mode de réalisation, le réactif stable à la température est de formule (2) :



20 dans laquelle :

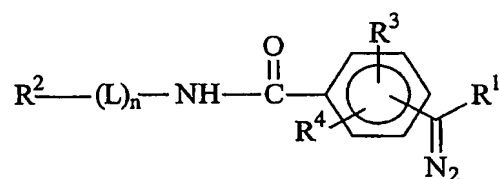
dans laquelle :

- R<sup>1</sup> représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- R<sup>2</sup> représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,

- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1, et
- $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^2-(L)_n-Y-X-$ , OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle.

5

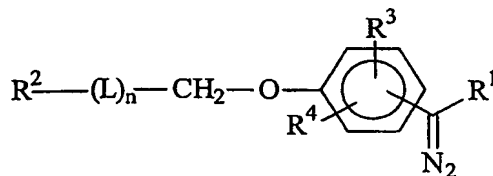
Avantageusement, selon une deuxième variante du deuxième mode de réalisation, le réactif stable à la température est de formule (3) :



dans laquelle :

- 10
- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
  - $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
  - L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1, et
- 15
- $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^2-(L)_n-Y-X-$ , OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle.

Avantageusement, selon une troisième variante du deuxième mode de réalisation, le réactif stable à la température est de formule (4) :



20

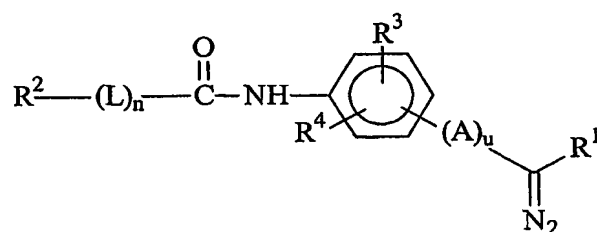
dans laquelle :

- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,

- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^2-(\text{L})_n-\text{Y}-\text{X}-$ , OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle.

5

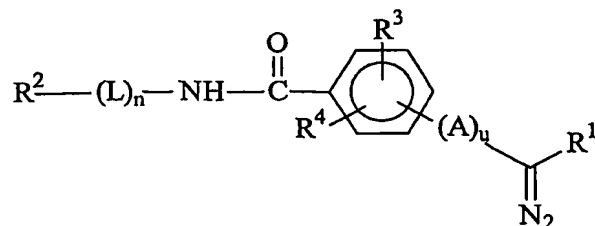
Avantageusement, selon une première variante du premier mode de réalisation, le réactif stable à la température est de formule (21) :



dans laquelle :

- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u égal 1, et
- $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^2-(\text{L})_n-\text{Y}-\text{X}-$ , OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle.

- 20 Avantageusement, selon une deuxième variante du premier mode de réalisation, le réactif stable à la température est de formule (22) :

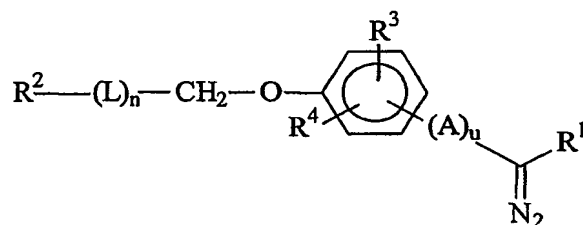


dans laquelle :



- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u égal 1, et
- $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^2-(L)_n-Y-X-$ , OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle.

Avantageusement, selon une troisième variante du premier mode de réalisation, le réactif stable à la température est de formule (23) :

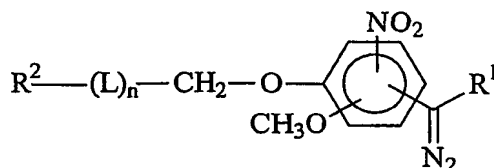


dans laquelle :

- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u égal 1, et
- $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^2-(L)_n-Y-X-$ , OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle.

Dans les formules ci-dessus (0) à (4) et (21) à (23), avantageusement  $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{OCH}_3$ ,  $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ ,  $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ .

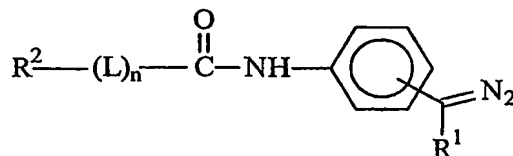
Ainsi, un composé préféré selon la troisième variante du deuxième mode de réalisation (formule (4)) est de formule (4') :



dans laquelle :

- R<sup>1</sup> représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- R<sup>2</sup> représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique, et
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1.

De même, un composé préféré selon la première variante du deuxième mode de réalisation (formule (2)) est de formule (2') :

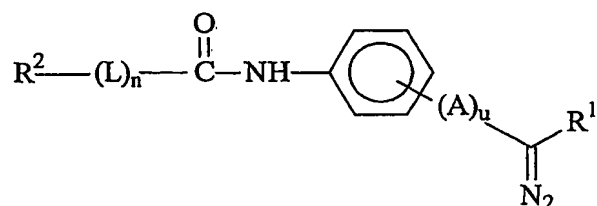


dans laquelle :

- R<sup>1</sup> représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- R<sup>2</sup> représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique, et
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1.

Avantageusement dans la formule (2'), le substituant portant la fonction diazométhyle est en *ortho* ou en *méta*.

De même, un composé préféré selon la première variante du premier mode de réalisation (formule (21)) est de formule (24) :



dans laquelle :

- $\text{R}^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- $\text{R}^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique, et
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u égal 1.

Par « structure multimérique », on entend un polymère formé d'unités répétées de synthons chimiques ou biologiques. Un exemple est cité dans l'exemple 34.2 de la description ci-après. De nombreuses variantes de telles structures utilisables dans la présente invention sont connues, comme par exemple :

- les polymères linéaires (EP-A-0.561.722, EP-A-0.669.991),
- les polymères ramifiés (WO-A-01/92361),
- les particules (EP-A-0 827 552),
- les dendrimères (US-A-4,507,466 ; US-A-4,568,737 ; US-A-6,083,708),
- les polynucléotides, et
- les polypeptides.

Par « marqueur détectable », on entend au moins un marqueur capable de générer directement ou indirectement un signal détectable. Une liste non limitative de ces marqueurs suit :

- les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence, luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la  $\beta$ -galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase,
- les chromophores comme les composés fluorescents, luminescents, colorants,

- les groupements à densité électronique détectable par microscopie électronique ou par leur propriété électrique comme la conductivité, l'ampérométrie, la voltamétrie, l'impédance,
- les groupements détectables, par exemple dont les molécules sont de tailles suffisantes pour induire des modifications détectables de leurs caractéristiques physiques et/ou chimiques, cette détection peut être réalisée par des méthodes optiques comme la diffraction, la résonance plasmon de surface, la variation de surface, la variation d'angle de contact ou des méthodes physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel,
- les molécules radioactives comme le  $^{32}\text{P}$ , le  $^{35}\text{S}$  ou le  $^{125}\text{I}$ .

10 De préférence, le marqueur n'est pas un marqueur radioactif pour éviter les problèmes de sécurité liés à ces marqueurs.

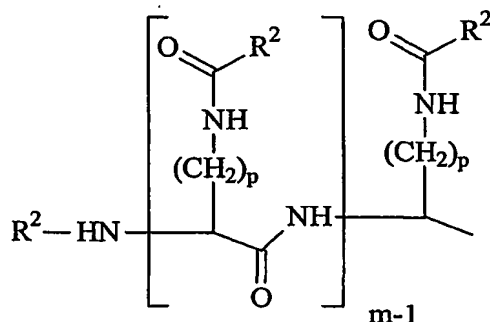
Dans un mode de réalisation particulier de la présente invention le marqueur est détectable électrochimiquement, et en particulier le marqueur est un dérivé d'un complexe de fer, comme un ferrocène.

15 Des systèmes indirects peuvent être aussi utilisés, comme par exemple des ligands capables de réagir avec un anti-ligand. Les couples ligand/anti-ligand sont bien connus de l'homme du métier, ce qui est le cas par exemple des couples suivants : biotine/streptavidine, haptène/anticorps, antigène/anticorps, peptide/anticorps, sucre/lectine, polynucléotide/complémentaire du polynucléotide. Dans ce cas, c'est le ligand qui porte la fonction réactive  
20 diazométhyle. L'anti-ligand peut être détectable directement par les marqueurs décrits au paragraphe précédent ou être lui-même détectable par un autre couple ligand/anti-ligand. Ce système d'empilement est illustré dans les exemples.

Un autre exemple de systèmes indirects utilise une liaison covalente spécifique entre le ligand et l'anti-ligand par exemple méthylcétone et alcoxyamine. Des exemples de ce système  
25 sont décrits dans les demandes de brevet WO-A-00/40590 et WO-A-98/05766. Ces systèmes de détection indirects peuvent conduire, dans certaines conditions, à une amplification du signal et l'on pourra se reporter aux demandes de brevet antérieures WO-A-00/07982, WO-A-01/92361 et WO-A-95/08000 pour des exemples d'amplification chimique en utilisant des polymères ou à la demande WO-A-01/44506 pour les systèmes d'amplification chimique par  
30 empilement.

Dans un mode particulier de l'amplification de signal, au moins deux marqueurs sont présents sur le réactif de marquage.

En particulier un réactif qui permet de mettre en oeuvre l'amplification de signal selon la présente invention possède une structure  $R^2-(L)_n$ - de formule (5) ci dessous :

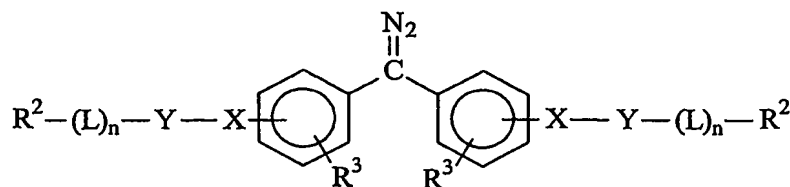


dans laquelle :

- $R^2$  représente un marqueur détectable,
- $m$  est un nombre entier compris entre 1 et 100, de préférence compris entre 1 et 20, et
- $p$  est un nombre entier compris entre 1 et 10, avantageusement 2 à 6, de préférence 4.

Cette structure de  $R^2-(L)_n$  s'applique indifféremment aux formules (0) à (4) et (21) à (23) précédentes.

Un autre réactif de marquage préféré pour l'amplification de signal est le réactif de formule (6) :

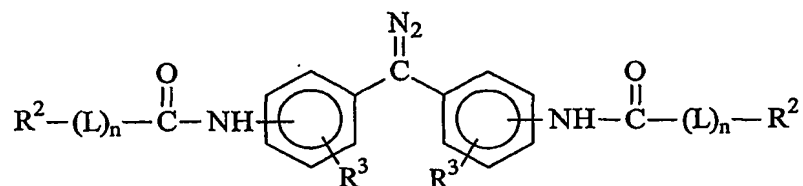


dans laquelle :

- $R^2$  représente un marqueur détectable,
- $R^3$  représente H,  $NO_2$ , Cl, Br, F, I, OR, SR,  $NR_2$ , R,  $NHCOR$ ,  $CONHR$ ,  $COOR$  avec R = alkyle ou aryle,

- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins 2 liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1, et
- -Y-X- représente -CONH-, -NHCO-, -CH<sub>2</sub>O-, -CH<sub>2</sub>S-.

5           Avantageusement le réactif pour l'amplification de signal a la formule (7)

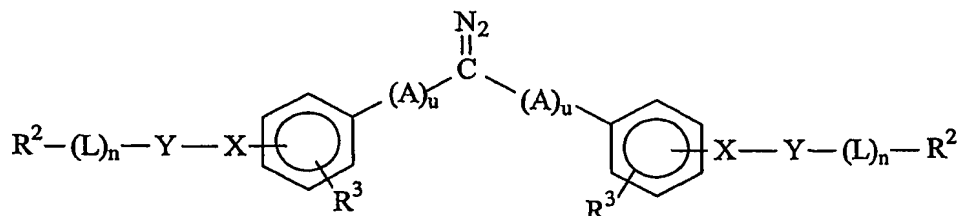


dans laquelle :

- R<sup>2</sup> représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- 10   • R<sup>3</sup> représente H, NO<sub>2</sub>, Cl, Br, F, I, R<sup>2</sup> -(L)<sub>n</sub>-Y-X-, OR, SR, NR<sub>2</sub>, R, NHCOR, CONHR, COOR avec R = alkyle ou aryle, de préférence R<sup>3</sup> représente H, NO<sub>2</sub>, OCH<sub>3</sub>, -CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-R<sup>2</sup> ou -CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-R<sup>2</sup>, et
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins 2 liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1.

15

Toujours un autre réactif de marquage préféré pour l'amplification de signal est le réactif de formule (25) :



dans laquelle :

- 20   • R<sup>2</sup> représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- R<sup>3</sup> représente H, NO<sub>2</sub>, Cl, Br, F, I, R<sup>2</sup> -(L)<sub>n</sub>-Y-X-, OR, SR, NR<sub>2</sub>, R, NHCOR, CONHR, COOR avec R = alkyle ou aryle,

- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u égal 1, et
- -Y-X- représente -CONH-, -NHCO-, -CH<sub>2</sub>O-, -CH<sub>2</sub>S-.

Dans un mode préféré de l'invention, le traceur est un composé fluorescent de faible encombrement stérique comme la fluorescéine, le dansyl, les chromophores du type IR (Li-COR Inc, Lincoln NE, USA), des dérivés cyanines comme le Cy5 et le Cy3 (Randolph J.B. and al, Nucleic Acids Res., 25(14), p2923-2929, 1997) et en particulier les dérivés du Cy5 ou bien le traceur est un haptène de faible encombrement stérique comme la biotine ou un dérivé de l'abiétane (voir la demande WO-A-00/07982). Par faible encombrement stérique, on entend un poids moléculaire inférieur à 1000 g/mole.

Dans le cas d'un fluorophore, il est préférable de travailler avec des fluorophores dont la longueur d'onde d'excitation est supérieure à 450 nm, de préférence supérieure à 600 nm.

Dans le cas où le traceur est un haptène qui ne produit pas de signal par lui-même comme par exemple la biotine, la détection est réalisée par la reconnaissance d'un anti-ligand marqué comme décrit plus haut. Dans le cas de la biotine, on utilise de préférence de la streptavidine ou un anticorps anti-biotine couplé à un composé fluorescent comme la fluorescéine, Cy5 ou la phycoérythrine. Dans le cas de l'abiétane, on utilise un anticorps monoclonal comme décrit dans la demande de brevet WO-A-00/07982.

En particulier les réactifs de marquage de l'invention sont solubles dans des solvants polaires comme le DMF, le DMSO, CH<sub>3</sub>CN, THF, DMA (diméthylacétamide), NMP (N-méthylpyrrolidone), DME (diméthoxyéthane).

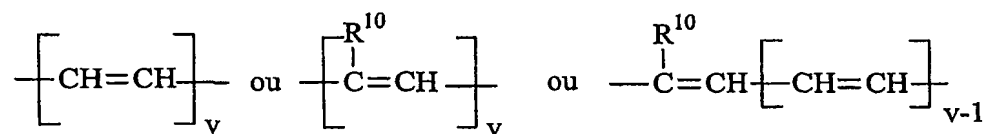
De préférence les réactifs de marquage sont solubles dans le DMSO ou l'eau.

Par solvant miscible à l'eau, on entend un solvant qui est miscible dans une proportion d'au moins 5% en volume avec de l'eau ou un tampon aqueux contenant des sels.

Avantageusement dans les formules précédentes, le bras L comprend un motif éthylène glycol ou polyéthylène glycol pour augmenter la solubilité du réactif dans l'eau.

A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison de type éthylénique

permettant la conjugaison de la fonction diazométhyle avec le cycle aromatique. Le bras de liaison A a pour fonction d'éloigner la fonction diazométhyle du cycle pour diminuer l'encombrement stérique tout en conservant la stabilité de la fonction diazométhyle. Par « conjugaison », on entend la délocalisation électronique du cycle aromatique le long de la chaîne carbonée du bras de liaison A. A titre d'exemple, le bras A peut avoir la structure suivante :



dans laquelle :

- v est un nombre entier compris entre 1 et 10, de préférence v est 1 ou 2, et
- R<sup>10</sup> est H ou un groupement alkyle, de préférence R<sup>10</sup> est H, méthyle ou éthyle.

Ces réactifs peuvent ainsi se fixer en phase homogène sur les molécules biologiques, la phase homogène étant constituée d'une solution sensiblement aqueuse c'est à dire contenant au moins 50% d'eau.

Par « molécule biologique », on entend un composé qui possède au moins un site de reconnaissance lui permettant de réagir avec une molécule cible d'intérêt biologique. A titre d'exemple on peut citer comme molécules biologiques les acides nucléiques, les antigènes, les anticorps, les polypeptides, les protéines, les haptènes.

Le terme « acide nucléique » signifie un enchaînement d'au moins deux désoxyribonucléotides ou ribonucléotides comprenant éventuellement au moins un nucléotide modifié, par exemple au moins un nucléotide comportant une base modifiée, telle que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine ou toute autre base modifiée permettant l'hybridation. Ce polynucléotide peut aussi être modifié au niveau de la liaison internucléotidique comme par exemple les phosphorothioates, les H-phosphonates, les alkyl-phosphonates, au niveau du squelette comme par exemple les alpha-oligonucléotides (FR 2 607 507) ou les PNA (M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc., 114, 1895-1897, 1992 ou les 2' O-alkyl ribose. L'acide nucléique peut être naturel ou synthétique, un oligonucléotide, un polynucléotide, un fragment d'acide nucléique, un ARN ribosomique, un ARN messager, un



ARN de transfert, un acide nucléique obtenu par une technique d'amplification enzymatique telle que :

- PCR (Polymerase Chain Reaction), décrite dans les brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159, et sa dérivée RT-PCR (Reverse Transcription PCR),  
5 notamment dans un format en une étape, tel que décrit dans le brevet EP-B-0.569.272,
- LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-A-0.201.184,
- RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet WO-A-90/01069,
- 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995,
- 10 • NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO-A-91/02818, et
- TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5,399,491.

On parle alors d'amplicons pour désigner les acides nucléiques générés par une technique d'amplification enzymatique.

- 15 Chacune de ces modifications peut être prise en combinaison pour peu qu'au moins un phosphate soit présent dans l'acide nucléique.

Par « polypeptide », on entend un enchaînement d'au moins deux acides aminés.

Par « acides aminés », on entend :

- 20
- les acides aminés primaires qui codent pour les protéines,
  - les acides aminés dérivés après action enzymatique, comme la trans-4-hydroxyproline,
  - les acides aminés naturels, mais non présents dans les protéines comme la norvaline, la N-méthyl-L leucine, la staline (voir Hunt S. dans Chemistry and Biochemistry of the amino acids, Barrett G.C., ed., Chapman and Hall, London, 1985), et
  - 25 • les acides aminés protégés par des fonctions chimiques utilisables en synthèse sur support solide ou en phase liquide et les acides aminés non naturels.

- Le terme « haptène » désigne des composés non immunogènes, c'est-à-dire incapables par eux-mêmes de promouvoir une réaction immunitaire par production d'anticorps, mais  
30 capables d'être reconnues par des anticorps obtenus par immunisation d'animaux dans des

conditions connues, en particulier par immunisation avec un conjugué haptène-protéine. Ces composés ont généralement une masse moléculaire inférieure à 3000 Da, et le plus souvent inférieure à 2000 Da et peuvent être par exemple des peptides glycosylés, des métabolites, des vitamines, des hormones, des prostaglandines, des toxines ou divers médicaments, les

5 nucléosides et nucléotides.

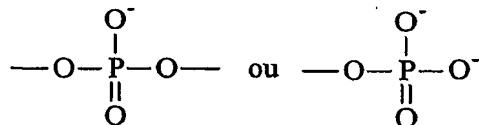
Le terme « anticorps » inclut les anticorps polyclonaux ou monoclonaux, les anticorps obtenus par recombinaison génétique, et des fragments d'anticorps tels que des fragments Fab ou F(ab')<sub>2</sub>.

Le terme « antigène » désigne un composé susceptible de générer des anticorps.

10 Le terme « protéine » inclut les holoprotéines et les hétéroprotéines comme les nucléoprotéines, les lipoprotéines, les phosphoprotéines, les métallopoteines et les glycoprotéines, aussi bien fibreuses que globulaires sous leur forme conformationnelle caractéristique.

Avantageusement la molécule biologique possède un groupe phosphate, c'est-à-dire

15 ayant au moins un motif :



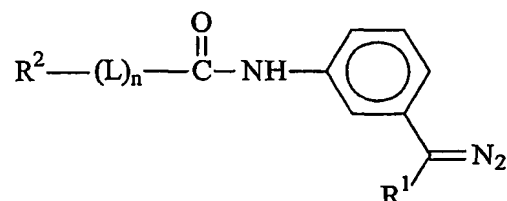
qui est soit présent naturellement dans la molécule biologique, soit peut être introduit par exemple par modification chimique ou enzymatique. Des exemples de modification chimique pour les protéines sont données dans « Chemistry of protein conjugation and cross linking »,

20 S.S. Wong, CRC Press, 1991.

De préférence, la molécule biologique est un acide nucléique.

Certains réactifs avantageux de l'invention sont :

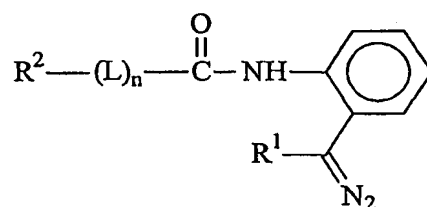
a) de formule (8) :



dans laquelle :

- 5 •  $\text{R}^1$  représente H ou un groupe alkyle ou aryle ou aryle substitué,
- $\text{R}^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes, et
- 10 • n un nombre entier égal à 0 ou 1.

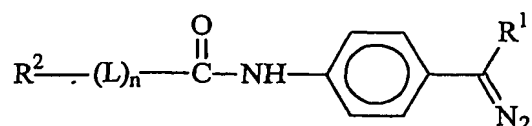
b) de formule (9) :



dans laquelle :

- $\text{R}^1$  représente H ou un groupe alkyle ou aryle ou aryle substitué,
- 15 •  $\text{R}^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes, et
- n un nombre entier égal à 0 ou 1.

20 c) de formule (10) :

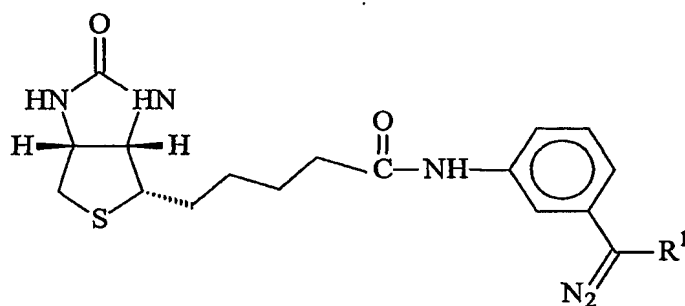


dans laquelle :

- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle ou aryle ou aryle substitué,
- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes, et
- n un nombre entier égal à 0 ou 1.

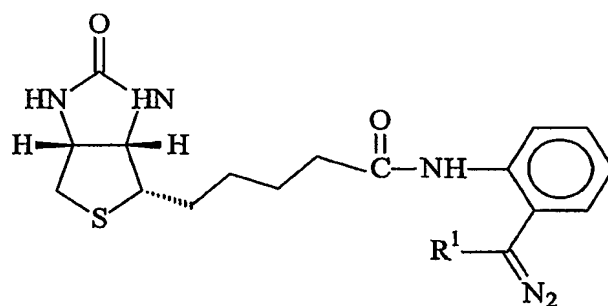
De préférence, le réactif de marquage a la :

a) formule (11) :



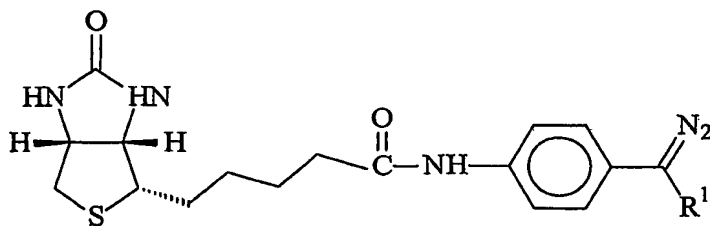
dans laquelle  $R^1$  représente un groupe méthyle ou un phényle.

b) formule (12) :



dans laquelle  $R^1$  représente un groupe méthyle ou phényle.

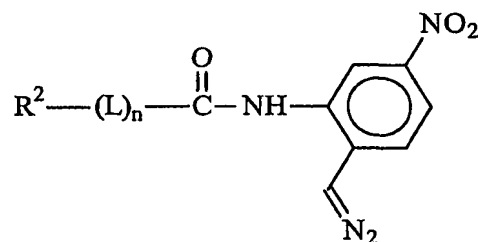
c) formule (13) :



dans laquelle  $R^1$  représente un groupe méthyle ou phényle.

D'autres réactifs préférés selon l'invention ont :

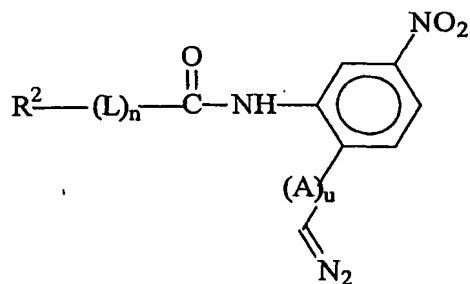
5 a) la formule (14) :



dans laquelle :

- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- 10 • L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes, et
- n un nombre entier égal à 0 ou 1.

b) la formule (26) :

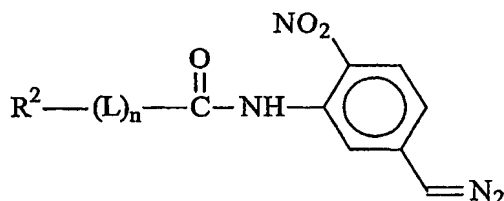


15

dans laquelle :

- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u égal 1, et
- 20 L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1.

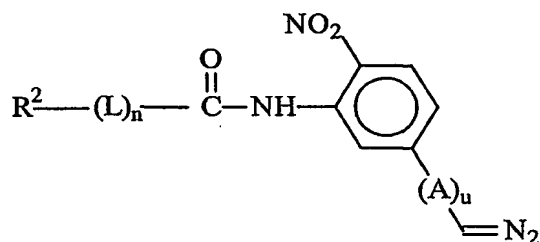
c) la formule (15) :



dans laquelle :

- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes, et
- n un nombre entier égal à 0 ou 1.

d) la formule (27) :



dans laquelle :

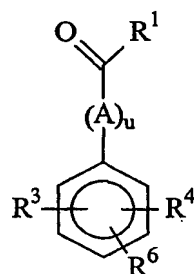
- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u égal 1, et
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1.

Quelque soit la variante et le mode de réalisation du réactif, L peut comprendre un motif  $-(O-CH_2-CH_2)-$ , répété de 1 à 20 fois, préférentiellement de 1 à 10 fois, et encore plus préférentiellement de 2 à 5 fois.

C'est un autre objet de la présente invention que de décrire un procédé de synthèse d'un réactif de marquage ainsi que les réactifs de marquage, stables à la température, susceptibles d'être obtenus par ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

5

a) on dispose d'un dérivé de formule (16 bis) :



dans laquelle :

- R<sup>1</sup> représente H ou un groupe alkyle ou aryle ou aryle substitué,
- 10 • R<sup>3</sup> et R<sup>4</sup> représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO<sub>2</sub>, Cl, Br, F, I, R<sup>6</sup>, OR, SR, NR<sub>2</sub>, R, NHCOR, CONHR, COOR avec R = alkyle ou aryle,
- R<sup>6</sup> représente COOH, COOM, NH<sub>2</sub>, OH ou SH avec M = alkyle, en particulier méthyle ou éthyle, et
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la
- 15 conjugaison de la fonction diazométhyle avec le cycle aromatique et u est un nombre entier égal à 0 ou 1,

b) on dispose d'un marqueur ou d'un précurseur de marqueur possédant une fonction réactive R<sup>7</sup> complémentaire de R<sup>6</sup>,

c) on fait réagir ensemble la fonction complémentaire dudit marqueur ou précurseur

20 de marqueur avec la fonction R<sup>6</sup> du dérivé de formule (16 bis) en présence d'au moins un agent de couplage pour former une liaison covalente,

d) on fait réagir un dérivé de l'hydrazine ou l'hydrazine sur la fonction cétone ou aldéhyde pour former une hydrazone, et

e) on transforme l'hydrazone en fonction diazométhyle à l'aide d'un traitement

25 approprié.

Si la fonction  $R^6$  est  $\text{COOH}$  ou  $\text{COOM}$ , la fonction complémentaire  $R^7$  est  $\text{NH}_2$ .

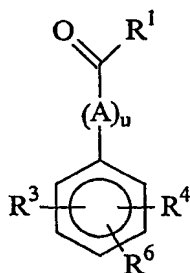
Si la fonction  $R^6$  est  $\text{NH}_2$ , la fonction complémentaire  $R^7$  est  $\text{COOH}$ .

Si la fonction  $R^6$  est  $\text{OH}$ , la fonction complémentaire  $R^7$  est choisie parmi :  
halogénure d'alkyle, sulfonate, tosylate.

5 Si la fonction  $R^6$  est  $\text{SH}$ , la fonction complémentaire  $R^7$  est choisie parmi :  
halogénure d'alkyle, maléimide.

Une variante du procédé de synthèse comprend les étapes suivantes :

a) on dispose d'un dérivé de formule (16 bis) :



10

dans laquelle :

- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle ou aryle ou aryle substitué,
- $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^6$ , OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R est alkyle ou aryle,
- 15 •  $R^6$  représente  $\text{COOH}$ ,  $\text{COOM}$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{OH}$  ou  $\text{SH}$  avec M est alkyle, en particulier méthyle ou éthyle, et
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazométhyle avec le cycle aromatique et u est un nombre entier égal à 0 ou 1,

20

b) on dispose d'un bras de liaison L possédant au moins deux fonctions réactives  $R^8$  identiques ou différentes, la première fonction  $R^8$  complémentaire de  $R^6$  et la deuxième fonction  $R^8$  complémentaire de  $R^7$ , et on dispose en outre d'un marqueur ou d'un précurseur de marqueur possédant une fonction réactive  $R^7$ ,

25

c) on fait réagir la première fonction réactive  $R^8$  du bras de liaison L avec le dérivé de formule (16 bis) en présence d'au moins un agent de couplage pour former une liaison covalente puis on fait réagir la deuxième fonction réactive  $R^8$  du bras de liaison L avec le



marqueur ou le précurseur de marqueur en présence d'au moins un agent de couplage pour former une liaison covalente,

d) on fait réagir un dérivé de l'hydrazine ou l'hydrazine sur la fonction cétone ou aldéhyde pour former une hydrazone, et

5 e) on transforme l'hydrazone en fonction diazométhyle à l'aide d'un traitement approprié.

Dans ce cas particulier, le procédé comprend une étape supplémentaire où le bras de liaison L est additionné sur le composé (16 bis) avant de faire réagir le marqueur ou  
10 précurseur de marqueur. Dans ce cas, le bras de liaison L porte au moins une première fonction réactive  $R^8$  complémentaire de  $R^6$ , pour permettre le couplage du bras L sur le composé (16 bis), et au moins une deuxième fonction  $R^8$ , permettant le couplage du marqueur ou précurseur de marqueur sur le bras de liaison L, les deux fonctions  $R^8$  portées par le bras L pouvant être identiques ou différentes en fonction de la stratégie de couplage et des fonctions  
15 réactives  $R^6$  et  $R^7$ , portées respectivement par le composé (16 bis) et le marqueur ou précurseur de marqueur.

Si la fonction  $R^6$  et/ou la fonction  $R^7$  est/sont COOH ou COOM, la première et/ou la deuxième fonction complémentaire  $R^8$  est/sont  $NH_2$ .

20 Si la fonction  $R^6$  et/ou la fonction  $R^7$  est/sont  $NH_2$ , la première ou la deuxième fonction complémentaire  $R^8$  est/sont COOH.

Si la fonction  $R^6$  et/ou la fonction  $R^7$  est/sont OH, la première et/ou la deuxième fonction complémentaire  $R^8$  est/sont choisie(s) indépendamment parmi : halogénure d'alkyle, sulfonate, tosylate.

25 Si la fonction  $R^6$  et/ou la fonction  $R^7$  est/sont SH, la première et/ou la deuxième fonction complémentaire  $R^8$  est/sont choisie(s) indépendamment parmi : halogénure d'alkyle, maléimide.

30 Dans le cas où le  $R^6$  est OH ou SH, l'agent de couplage est une base telle la potasse ou le carbonate de potassium ou une base organique.

Dans le cas où le  $R^6$  est COOH ou  $NH_2$ , l'agent de couplage est choisi par exemple

parmi les agents de couplage utilisés en synthèse peptidique. On pourra se reporter à l'ouvrage « Peptide Chemistry, a practical textbook » de M. Bodansky, ed Springer Verlag, Berlin, 1988, chapitre V, pages 55-73.

Par « dérivé de l'hydrazine », on entend une molécule possédant la fonction  $\text{NH}_2\text{-NH-}$ . Le tosylhydrazine est un exemple d'un tel dérivé.

La transformation de l'hydrazone en diazométhyle est réalisée par les méthodes usuelles, en particulier l'oxydation par  $\text{MnO}_2$ .

D'autres méthodes sont utilisables comme décrites dans X. Creary, Organic Syntheses, Wiley : New York, Coll. Vol. VII, p438-443, 1990; H. Zollinger, Diazo Chemistry II, VCH, Weinheim, p34-47, 1995; T. L. Holton and H. Shechter, J. Org. Chem., 60, 4725-4729, 1995.

Dans le cas de l'utilisation d'un dérivé tosylhydrazine, la méthode est décrite dans X. Creary, Organic Syntheses ; Wiley : New York, Coll. Vol. VII, p438-443, 1990.

15

Dans un mode particulier de l'un quelconque des procédés, ledit procédé comprend :

- une étape supplémentaire de protection de la fonction cétone ou aldéhyde (dans le cas où  $\text{R}^1$  est H) du composé (16 bis), et
- une étape supplémentaire ultérieure de déprotection de ladite fonction cétone ou aldéhyde.

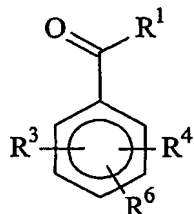
20

Cette protection est réalisée par un groupement acétal par exemple. La déprotection est effectuée par un moyen approprié comme en milieu acide pour le groupement acétal. L'homme du métier détermine en fonction des composés à quelle étape de synthèse ces deux étapes de protection et de déprotection interviennent.

25

Selon un autre mode de la présente invention est décrit un procédé de synthèse d'un réactif de marquage ainsi que les réactifs de marquage, stables à la température, susceptibles d'être obtenus par ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un dérivé de formule (16) :



dans laquelle :

- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle ou aryle ou aryle substitué,
- 5 •  $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^6$ , OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle, et
- $R^6$  représente  $\text{COOH}$ ,  $\text{NH}_2$ , OH ou SH.

b) on dispose d'un marqueur ou d'un précurseur de marqueur possédant une fonction réactive  $R^7$  complémentaire de  $R^6$ ,

- 10 c) on fait réagir ensemble la fonction complémentaire dudit marqueur ou précurseur de marqueur avec la fonction  $R^6$  du dérivé de formule (16) en présence d'au moins un agent de couplage pour former une liaison covalente,

d) on fait réagir l'hydrazine ou un de ses dérivés sur la fonction cétone ou aldéhyde pour former une hydrazone, et

- 15 e) on transforme l'hydrazone en fonction diazométhyle à l'aide d'un traitement approprié.

Si la fonction  $R^6$  est  $\text{COOH}$ , la fonction complémentaire  $R^7$  est  $\text{NH}_2$ .

- 20 Si la fonction  $R^6$  est  $\text{NH}_2$ , la fonction complémentaire  $R^7$  est  $\text{COOH}$ .

Si la fonction  $R^6$  est OH, la fonction complémentaire  $R^7$  est choisie parmi : halogénure d'alkyle, sulfonate, tosylate.

Si la fonction  $R^6$  est SH, la fonction complémentaire  $R^7$  est choisie parmi : halogénure d'alkyle, maléimide.

- 25 Dans le cas où le  $R^6$  est OH ou SH, l'agent de couplage est une base telle la potasse ou le carbonate de potassium.

Dans le cas où le  $R^6$  est  $\text{COOH}$  ou  $\text{NH}_2$ , l'agent de couplage est choisi par exemple parmi les agents de couplage utilisés en synthèse peptidique. On pourra se reporter à l'ouvrage « Peptide Chemistry, a practical textbook » de M. Bodansky, ed Springer Verlag, Berlin, 1988, chapitre V, pages 55-73.

5

Par « dérivé de l'hydrazine », on entend une molécule possédant la fonction  $\text{NH}_2\text{-NH-}$ . Le tosylhydrazine est un exemple d'un tel dérivé.

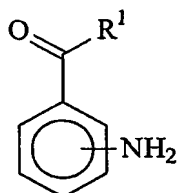
La transformation de l'hydrazone en diazométhyle est réalisée par les méthodes usuelles, en particulier l'oxydation par  $\text{MnO}_2$ .

10 D'autres méthodes sont utilisables comme décrites dans X. Creary, Organic Syntheses, Wiley : New York, Coll. Vol. VII, p438-443, 1990; H. Zollinger, Diazo Chemistry II, VCH, Weinheim, p34-47, 1995; T. L. Holton and H. Shechter, J. Org. Chem., 60, 4725-4729, 1995. Dans le cas de l'utilisation d'un dérivé tosylhydrazine, la méthode est décrite dans X. Creary, Organic Syntheses ; Wiley : New York, Coll. Vol. VII, p438-443, 1990.

15

Un procédé préféré selon l'invention est un procédé où :

a) on dispose d'un dérivé de formule (17) :



dans laquelle  $R^1$  représente H ou un groupe alkyle ou aryle ou aryle substitué,

20

b) on dispose d'un marqueur ou d'un précurseur de marqueur possédant une fonction acide carboxylique,

c) on fait réagir ensemble la fonction carboxylique dudit marqueur ou précurseur de marqueur et la fonction amine primaire du dérivé de formule (17) en présence d'au moins un agent de couplage pour former une liaison amide,

25

d) on fait réagir de l'hydrazine sur la fonction cétone ou aldéhyde provenant du dérivé de formule (17) pour former une hydrazone, et

e) on oxyde ladite hydrazone en présence de  $\text{MnO}_2$  pour former une fonction diazométhyle.

Dans tous les procédés décrits précédemment et avantageusement, le groupe alkyle est un groupe linéaire ou ramifié en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> et le groupe aryle est un groupe phényle éventuellement substitué.

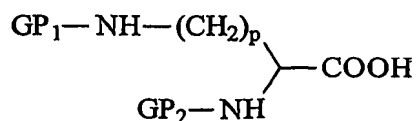
De préférence R<sup>4</sup> est un méthyle ou un phényle c'est à dire que le dérivé de formule (17) est l'acétophénone ou la benzophénone substitué par l'amine en position *ortho méta* ou *para*.

La fonction amine du dérivé (17) est en position *ortho méta* ou *para* en fonction du produit final désiré, de préférence en position *ortho* ou *méta*.

L'agent de couplage est choisi parmi les agents de couplage notamment utilisé en synthèse peptidique comme décrit précédemment et par exemple iBuOCOC<sub>l</sub> en présence d'une base comme la N-méthylmorpholine.

Par « précurseur de marqueur », on entend un composé ayant au moins une fonction réactive éventuellement protégée différente de la fonction diazométhyle et compatible avec ladite fonction qui permet la fixation d'un marqueur ultérieurement, c'est à dire après l'une quelconque des étapes du procédé et en particulier après l'étape d'oxydation par MnO<sub>2</sub>. En particulier, la précurseur de marqueur peut comprendre le bras de liaison L. Un exemple de stratégie utilisant un précurseur de marqueur est donnée ci-dessous dans le cas de l'amplification de signal mais d'autres variantes sont possibles en utilisant les différents groupements protecteurs qui sont bien connus de l'homme du métier.

Dans le cas de l'amplification de signal, le procédé de synthèse est similaire. Le précurseur du marqueur a la formule (18) ci-dessous.



dans laquelle GP<sub>1</sub> et GP<sub>2</sub> représentent deux groupements protecteurs de fonction amine identiques ou différents et p est un nombre entier compris entre 1 et 10, avantageusement 2 et

6 de préférence 4. Avantageusement, GP<sub>1</sub> et GP<sub>2</sub> sont différents pour pouvoir additionner plusieurs motifs comme cela est expliqué ci-dessous.

Des exemples de groupement protecteurs GP<sub>1</sub> ou GP<sub>2</sub> utilisables dans la présente invention sont données dans T.W. Greene and P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic  
5 Synthesis, 2<sup>ème</sup> édition, John Wiley and Sons, New York, 1991, préférentiellement ceux couramment utilisés en synthèse peptidique comme Boc (tertiobutyloxycarbonyl), Fmoc (9-fluorénylméthylèneoxycarbonyl), Cbz (carboxybenzyle) ou Alloc (allyloxycarbonyl).

En particulier GP<sub>1</sub> et GP<sub>2</sub> sont respectivement les groupements protecteurs Boc et Fmoc.

10

La réaction entre ce précurseur qui possède une fonction carboxylique et le dérivé de formule (17) a lieu en présence d'un agent de couplage pour former la liaison amide. Après déprotection dans des conditions usuelles d'un des deux groupements protecteurs, par exemple Fmoc avec une base telle que la pipéridine, la fonction amine libérée est utilisée pour  
15 coupler une autre molécule de formule (18). Ce processus est répété autant de fois que nécessaire pour obtenir une multitude de fonctions NH<sub>2</sub> protégé par un groupement protecteur par exemple une fonction Boc. Le motif est additionné entre une (1) et cent (100) fois, de préférence entre une (1) et vingt (20) fois.

On fait réagir de l'hydrazine sur la fonction cétone provenant du dérivé phénylcétone  
20 pour former une hydrazone puis on oxyde en présence de MnO<sub>2</sub> pour former un résidu diazométhyle. Puis après déprotection de la fonction amine portant le groupement Boc, un traceur, par exemple une biotine activée par un groupement N-hydroxysuccinimide, est couplé sur les fonctions amines pour conduire à un réactif dont le motif R<sup>2</sup>-(L)<sub>n</sub>- est celui de la formule (5).

25

C'est un autre objet de la présente invention que de décrire un procédé, ainsi que les produits obtenus par ce procédé, pour le marquage d'une molécule biologique, en particulier un acide nucléique, comprenant la mise en contact en solution, dans une solution homogène sensiblement aqueuse, d'une molécule biologique et d'un réactif de marquage selon  
30 l'invention.

Par « solution sensiblement aqueuse », on entend une solution contenant au moins 50% d'eau. Cette solution contient de préférence des sels comme une solution tampon.

Par « solution homogène », on entend une solution monophasique telle qu'une solution eau/DMSO par opposition à une solution biphasique telle qu'une solution eau/chloroforme.

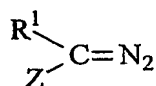
Les conditions particulières pour les réactions de marquage varient en fonction des molécules biologiques et du marqueur. En ce qui concerne les acides nucléiques, un pH compris entre 5 et 8 permet un marquage efficace. En particulier, un pH compris entre 5,5 et 7,0 est préféré pour l'ensemble des réactifs de l'invention. Avec le réactif de formule (11), la gamme de pH est plus large pour le marquage. Une bonne efficacité de marquage est obtenue pour un pH compris entre 3 et 8 pour ce réactif.

En particulier, le procédé de marquage et de fragmentation d'un acide nucléique simple ou double brin comprend les étapes suivantes dans un ordre quelconque :

- fragmenter l'acide nucléique,

- attacher un marqueur sur au moins un des fragments par l'intermédiaire d'un réactif de marquage choisi parmi les composés :

de formule (19) :



dans laquelle :

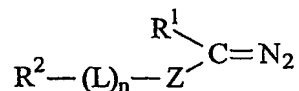
- R<sup>1</sup> représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué, et
- Z comprend un marqueur détectable,

ledit réactif se couplant de manière covalente et majoritaire sur au moins un phosphate dudit fragment.

Les radicaux Z et/ou R<sup>1</sup> sont choisis pour stabiliser la fonction diazométhyle, c'est-à-dire au moins un des deux groupes Z ou R<sup>1</sup> a un noyau phényle.

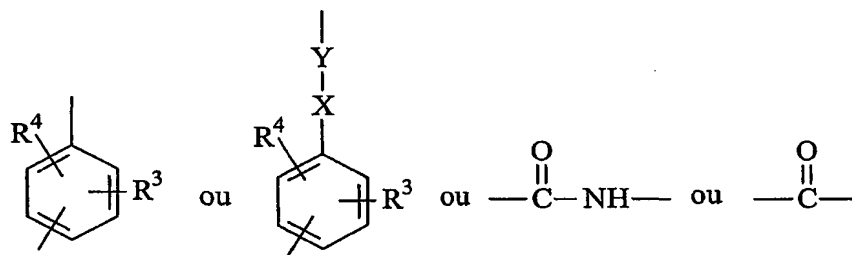
La liaison entre le réactif de marquage et l'acide nucléique est covalente mais il a été précédemment décrit que des interactions non covalentes pouvaient être utilisées notamment dans les systèmes d'empilement, ou dans le cas où le marqueur est détectable indirectement. Le terme « attacher » couvre donc ces différentes possibilités.

De préférence, le réactif de marquage est choisi parmi les composés de formule (20) :



dans laquelle :

- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- 5 •  $R^2$  est un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n est égal à 0 ou 1, et
- Z est choisi parmi :

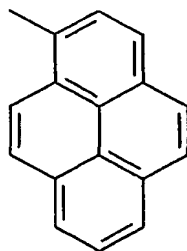


dans lequel :

- $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I, OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle, et
- -Y-X- représente -CONH-, -NHCO-, - $\text{CH}_2\text{O}$ -, - $\text{CH}_2\text{S}$ -.

15

Dans un mode particulier selon la formule (19), Z a la structure suivante :



Dans ce cas et si  $R^1$  égal H, le réactif de marquage est le 1-Pyrényldiazométhane (PDAM).

20 Bien que ce marqueur soit fluorescent, la longueur d'onde d'excitation est trop proche de celles des acides nucléiques. Une détection indirecte par l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre le motif pyrène est préférée. Le mode d'obtention de cet anticorps



est bien connu de l'homme du métier (voir par exemple la demande de brevet WO-A-00/07982).

Les autres nouveaux réactifs selon l'invention qui sont décrits par les formules (1) à  
5 (27) ainsi que les réactifs susceptibles d'être obtenus par les procédés de synthèse selon l'invention sont aussi des réactifs préférés selon le procédé de fragmentation et de marquage décrit ci-dessus.

Ce procédé de marquage et de fragmentation est particulièrement utile dans le cas où  
10 l'acide nucléique marqué doit s'hybrider avec une multitude d'acides nucléiques, notamment oligonucléotides, fixés sur le support solide à une position prédéterminée pour former une puce à ADN. Par "puce à ADN", on entend un support solide de dimension réduite où sont fixés une multitude de sondes de capture à des positions prédéterminées. En effet, la densité des acides nucléiques fixés sur le support solide impose des contraintes stériques importantes  
15 lors de l'hybridation et la fragmentation permet d'améliorer cette étape d'hybridation. Des exemples de ces puces à ADN sont donnés par exemple dans les publications de G. Ramsay, Nature Biotechnology, 16, p40-44, 1998; F. Ginot, Human Mutation, 10, p1-10, 1997; J. Cheng et al, Molecular diagnosis, 1(3), p183-200, 1996; T. Livache et al, Nucleic Acids Research, 22(15), p2915-2921, 1994; J. Cheng et al, Nature Biotechnology, 16, p541-546,  
20 1998.

La fragmentation et le marquage s'effectue en une étape ou en deux étapes et le marquage peut s'effectuer indifféremment avant, après ou simultanément avec la fragmentation.

25 De préférence, le marquage et la fragmentation s'effectue simultanément c'est-à-dire que les réactifs nécessaires à ces deux étapes sont mis ensemble en solution homogène sensiblement aqueuse avec l'acide nucléique par exemple. C'est notamment le cas pour la fragmentation chimique ou enzymatique. Dans le cas de la fragmentation mécanique par un moyen physique, marquage et fragmentation s'effectuant simultanément signifie que le moyen  
30 physique est appliqué à une solution homogène sensiblement aqueuse contenant au moins les acides nucléiques et le réactif de marquage.

La fragmentation de l'acide nucléique s'effectue par voie enzymatique, chimique ou physique.

La fragmentation par voie enzymatique de l'acide nucléique est réalisée par exemple  
5 par des nucléases.

La fragmentation par voie physique de l'acide nucléique est réalisée par exemple par sonication ou par radiation.

La fragmentation par voie chimique, si l'acide nucléique est un ARN, est réalisée par les méthodes usuelles (voir par exemple Chem. Rev, 98, 961-990, 1998 de Oivanen M. et al.).

10 Les complexes de métaux, tels que décrits dans la revue de G. Pratviel et al, Adv. Org. Chem., 45, p251-312, 1998 ou la revue G. Pratviel et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 34, p746-769, 1995, sont utilisables pour la fragmentation de l'ADN ou l'ARN.

Dans un premier mode de réalisation, la fragmentation chimique d'ARN est réalisée par des cations métalliques associés ou non à un catalyseur chimique. Dans ce cas, les cations  
15 métalliques sont des ions  $Mg^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Ru^{3+}$ ,  $Ce^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$ ,  $Tm^{3+}$ ,  $Yb^{3+}$  ou  $Lu^{3+}$ , le catalyseur chimique est constitué par de l'imidazole, un analogue substitué, par exemple le N-méthyl-imidazole, ou toute molécule chimique ayant une affinité pour l'ARN et portant un noyau imidazole ou un analogue substitué. Les conditions de fragmentation à l'aide de métaux sont bien décrites dans la demande de brevet  
20 WO-A-99/65926. Avantagusement, les métaux sont  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Tb^{3+}$  ou  $Ce^{3+}$ , de préférence  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ .

Des conditions efficaces de fragmentation sont obtenues avec une concentration en cation métallique comme  $Mn^{++}$  entre 2 et 100 mM, une concentration en imidazole entre 2 et 100mM.

25 Des conditions spécialement efficaces sont obtenues avec une concentration en cation comme  $Mn^{++}$  comprise entre 3 et 15 mM, et une concentration en imidazole comprise entre 20 et 50 mM, en particulier 30 mM.

Le pH de la réaction doit être compris entre 5 et 8. Avantagusement, le pH est compris entre 5,5 et 6,5 de préférence le pH est de 6. Le pH de 6 représente donc un  
30 compromis très intéressant pour réaliser la combinaison marquage et fragmentation avec de l'ARN (voir discussion précédente sur le marquage).

Dans un deuxième mode de réalisation, la fragmentation chimique de l'ARN est réalisée par action d'une polyamine, comme la spermine, la putrescine ou la cadavérine. Des concentrations de 5 à 100 mM permettent la fragmentation. Celle-ci est totale à partir de 10 mM de polyamine.

5 Dans un troisième mode de réalisation, la fragmentation chimique de l'ARN est réalisée par action d'une nucléase artificielle (voir G. Pratviel et al., Adv. Inorg. Chem., 45, p251-312, 1998; D. S. Sigman et al. Chem. Rev., 93, p2295-2316, 1993), comme la 1,10-phénanthroline associée à un cation métallique comme le fer, le cuivre ou le zinc. Ces cations proviennent respectivement de FeSO<sub>4</sub> ou CuCl<sub>2</sub> ou ZnCl<sub>2</sub> en solution. Des concentrations  
10 entre 2 et 50 mM de 1,10-phénanthroline sont utilisées pour la fragmentation d'ARN en particulier entre 4 et 10 mM.

La fragmentation par voie chimique de l'ADN est réalisée en mettant en présence l'acide nucléique avec un moyen chimique de création de site abasique. La formation d'un site  
15 abasique résulte de la coupure de la liaison N-glycosidique qui lie le sucre 2-désoxyribose à la base nucléique. Il s'agit d'une dépurination pour la perte d'une purine (guanine, adénine) ou d'une dépyrimidination pour les pyrimidiques (cytosine, thymine).

Cette dépurination est spontanée dans des conditions physiologiques (pH 7,4 à 37°C) mais la vitesse de la réaction est très faible de l'ordre de  $3.10^{-11}$  dépurination par seconde,  
20 c'est-à-dire inutilisable pour une fragmentation efficace. Pour augmenter la vitesse de réaction, on utilise des agents alkylants qui fragilisent la liaison N-glycosidique ou des enzymes comme des ADN glycosylases, en particulier l'uracile ADN glycosilase.

Le site abasique obtenu par dépurination ou dépyrimidation est très instable. La fragmentation au niveau de ce site est obtenue à température ambiante en milieu basique. En  
25 milieu acide, la température élevée accélère également cette fragmentation. L'utilisation de molécules capables d'initier le phénomène de  $\beta$ -élimination accélère aussi la fragmentation.

Un mode préféré de réalisation de la fragmentation est obtenu par l'utilisation d'un pH acide c'est-à-dire un pH inférieur à 5. Avantageusement le pH est de 3.

Un tampon formiate de sodium à pH 3 permet de fragmenter de manière efficace selon  
30 l'invention. Ce tampon est compatible avec les conditions de marquage en une étape comme

cela sera démontré dans les exemples. Encore plus avantageusement, un milieu acide (HCl, carbonate,  $H_2SO_4$ ) est utilisé.

Dans un mode particulier de la présente invention et dans le but d'augmenter encore la  
5 fragmentation, l'acide désoxyribonucléique contient au moins une base modifiée susceptible de générer un site abasique plus facilement.

Diverses bases modifiées sont utilisables comme les N7-alkyl purines, les N3-alkyl purines, les O6-alkyl purines, les 8-bromopurines, les 8-thiopurines, les 8-alkylthiopurines, les  
10 8 azidopurines ou les 8-alkylsulfonylpurines.

Dans le cas où l'acide nucléique à marquer est généré par une technique d'amplification enzymatique comme la PCR, l'utilisation d'une 8-bromopurine permet d'avoir une incorporation efficace pendant l'amplification, ce qui facilite d'autant le procédé  
15 de fragmentation et de marquage selon l'invention, tout en conservant une sensibilité excellente pour l'étape d'amplification enzymatique.

La présente invention décrit une molécule biologique marquée et en particulier un acide nucléique marqué, susceptible d'être obtenu(e) par l'un quelconque des procédés selon  
20 l'invention.

La présente invention concerne aussi un kit de détection d'une molécule biologique, en particulier un acide nucléique cible comprenant un réactif de marquage selon l'invention. En fonction des applications du kit, d'autres éléments comme par exemple, des moyens de lyse  
25 (micro-organismes et/ou cellules) et/ou des moyens de concentration (comme de la silice ou des particules magnétiques) et/ou des moyens d'amplification enzymatique sont incorporés dans le kit.

L'invention concerne l'utilisation d'une molécule biologique marquée, en particulier  
30 un acide nucléique marqué tel que défini ci-dessus, comme sonde de détection d'une molécule biologique cible, et en particulier d'un acide nucléique cible.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un acide nucléique tel que défini ci-dessus, comme cible marquée pouvant se fixer sur une sonde de capture.

5 Pour permettre la détection et/ou la quantification et/ou la purification de la molécule biologique cible, la molécule biologique marquée est capable de former un complexe avec la molécule biologique cible. A titre d'exemple, pour la mise en évidence d'une molécule cible de type acide nucléique, l'acide nucléique marqué est suffisamment complémentaire de la cible pour s'hybrider spécifiquement en fonction des conditions de réaction, et notamment de  
10 la température ou de la salinité du milieu réactionnel.

Le procédé de détection est applicable pour le séquençage, le profil d'expression des ARN messagers ou le criblage de mutations à des fins de recherche ainsi que le criblage de drogues dans l'industrie pharmaceutique, le diagnostic de maladies infectieuses ou génétiques, le contrôle alimentaire ou industriel.

15 La tendance en matière de diagnostic et notamment pour les maladies infectieuses (SIDA ou Tuberculose par exemple) est de baisser le niveau de sensibilité, jusqu'à la détection d'une molécule unique dans un échantillon qui peut représenter plusieurs millilitres dans le cas d'un prélèvement liquide type sang ou urine ou liquide céphalo-rachidien. Ce niveau de sensibilité ne peut être obtenu que si toutes les étapes depuis le prélèvement de l'échantillon  
20 jusqu'au rendu de résultat sont optimisées. Les différents moyens de l'invention permettent cette optimisation sans difficulté car les réactifs, méthodes et procédés de l'invention sont applicables de manière très large à différentes molécules biologiques. En particulier dans le cas où une étape d'amplification enzymatique est nécessaire pour obtenir la sensibilité nécessaire (infection virale ou bactérienne comme VIH, VHC ou Tuberculose), un procédé de  
25 marquage et/ou de fragmentation, comme décrit dans la présente invention, permet de ne pas affecter la sensibilité de la technique d'amplification, soit parce qu'il n'est pas nécessaire de remplacer les désoxyribonucléotides ou les ribonucléotides utilisés dans la technique d'amplification enzymatique, soit parce que les ribonucléotides ou désoxyribonucléotides incorporés n'altèrent pas la sensibilité.

La chimie de greffage décrite dans la présente invention possède des caractéristiques telles, du point de vue réactivité et spécificité, que d'autres applications sont décrites ci-après :

- Dans un premier mode de réalisation, cette chimie de greffage est appliquée à la fixation covalente d'acides nucléiques sur un support solide.
- 5 • Dans une première variante du procédé, un précurseur de la fonction diazométhyle, tel une cétone ou hydrazine comme décrit précédemment, est introduit pendant la synthèse chimique et la fonction diazométhyle est introduite sur les acides nucléiques dans une deuxième étape.
- Dans une deuxième variante préférée du procédé, les fonctions diazométhyles sont  
10 introduites sur le support solide et les acides nucléiques sont fixés sur le support solide par l'intermédiaire des phosphates des acides nucléiques et en particulier des phosphates terminaux (5' ou 3').

L'introduction de phosphate à l'extrémité 3' ou 5' des acides nucléiques est bien connue (voir « Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties » édité  
15 par S. Agrawal, Humana Press, Totowa, New Jersey).

Dans un mode de réalisation particulier d'un tel support solide, un réactif de marquage portant un ligand, en particulier un haptène comme la biotine ou l'abiétane, est fixé sur le support solide sur lequel est fixé de manière covalente ou par adsorption un anti-ligand,  
20 comme la streptavidine ou un anticorps par exemple. Ces supports solides sont bien connus dans l'état de la technique et sont même commercialement disponibles (plaque de microtitration-streptavidine ou latex-streptavidine par exemple). La fonction du marqueur n'est plus dans ce cas de permettre la détection mais de permettre la fixation du réactif de marquage sur le support solide. La fonction diazométhyle est alors disponible pour réagir sur  
25 des acides nucléiques. Les dérivés de formule (11), (12), (13) ou le dérivé PDAM sont des exemples de réactifs utilisables pour la fabrication d'un tel support solide. La technique des anticorps monoclonaux permet de préparer des anticorps contre un grand nombre de marqueur comme la fluorescéine ou un dérivé du Cy5. L'homme du métier peut mettre en œuvre un support solide avec les réactifs de marquage de la présente invention sans difficulté excessive  
30 par ce mode de préparation indirect du support solide dans lequel une réaction ligand/anti-ligand est utilisée pour fixer la fonction diazométhyle sur le support solide.

Un deuxième mode de réalisation du support solide concerne les supports particuliers comme les latex. Différents modes de polymérisation peuvent être utilisés pour préparer les particules portant une fonction diazométhyle à partir d'un monomère fonctionnel polymérisable portant soit une fonction diazométhyle soit préférentiellement une fonction précurseur de la fonction diazométhyle comme un aldéhyde ou une cétone et notamment :

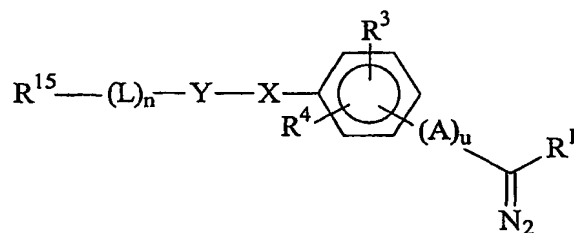
- Polymérisation à réacteur fermé appelée « batch » : les monomères sont introduits dans le réacteur avant le début de réaction avec les autres ingrédients et sans ajout ultérieur. En raison de la différence de réactivité des monomères, ce procédé conduit souvent à l'apparition d'une dérive de composition. Celle-ci se manifeste par l'obtention de macromolécules ayant des compositions qui varient considérablement en fonction de la conversion. Cette méthode est peu efficace pour l'incorporation en surface car une partie importante du monomère fonctionnel risque d'être perdue soit à l'intérieur des particules, soit sous forme de polymère hydrosoluble. Lorsque la copolymérisation est effectuée en « batch » avec des monomères de nature polaire, on obtient des particules plus petites, en grand nombre, mais avec une conversion limitée. Ce comportement est lié à l'importante solubilité dans l'eau de ces monomères, et il est attribué à la prépondérance du mécanisme de nucléation homogène.
- Polymérisation en semi-continu : une partie au moins des monomères est introduite dans le réacteur sur une période comprise entre le début de la réaction et la fin de celle-ci. Ce rajout peut être effectué à une vitesse fixe ou bien suivant un profil donné. Le but est de contrôler l'addition du mélange de monomères de façon à obtenir un copolymère de composition contrôlée (contrôle de la composition de l'interface); c'est ainsi qu'on se place souvent dans des conditions d'addition telles que la vitesse de polymérisation soit plus grande que celle d'addition.
- Polymérisation par addition différée appelée « shot » : une fois que la réaction de polymérisation est en cours, le monomère fonctionnel seul, ou en présence du monomère de base, est introduit dans le système d'une façon contrôlée. Le succès de l'opération dépend donc du degré de connaissance préalable de la cinétique de copolymérisation. C'est une méthode efficace pour favoriser l'incorporation superficielle. La sélection des

conditions expérimentales (degré de conversion au moment de l'addition, composition et concentration du mélange des monomères) permet d'optimiser les rendements de surface.

- Polymérisation sur semence : elle consiste à introduire le monomère fonctionnel dans le système contenant un latex déjà constitué et parfaitement caractérisé. Le monomère fonctionnel peut être additionné seul ou en mélange avec le monomère de base de la semence, en une étape ou en semi-continu.

Les techniques de polymérisation sur semence, polymérisation par addition différée, polymérisation en semi-continu sont préférées car elles conduisent à un maximum d'incorporation du dérivé portant le précurseur de la fonction diazométhyle en surface. Des exemples de particules portant des fonctions aldéhydes sont donnés par exemple dans B. Charleux et al, Die Makromolecular Chem., 193, p 187 et p. 205, 1992 ou dans le brevet EP-B-0.350.407.

C'est un autre objet de la présente invention que de décrire un intermédiaire de fixation stable à la température de formule (30) :



dans laquelle :

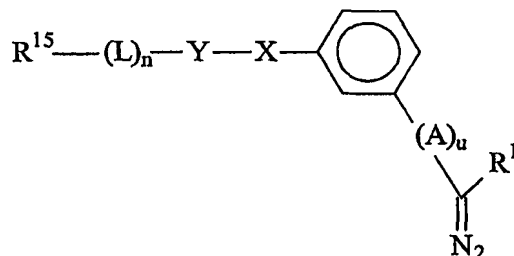
- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- $R^{15}$  représente une fonction réactive nucléophile ou électrophile, en particulier COOH,  $NH_2$ , SH, OH, O- $NH_2$ , alkylcétone, aldéhyde, isocyanate, isothiocyanate, maléimide, halogénure d'alkyle, ester activé, tosylate
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $NO_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^{15}-(L)_n-Y-X-$ , OR, SR,  $NR_2$ , R,  $NHCOR$ ,  $CONHR$ ,  $COOR$  avec R = alkyle ou aryle,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la



conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u est un nombre entier compris entre 0 et 2, préférentiellement de 0 ou 1, et

- -Y-X- représente -CONH-, -NHCO-, -CH<sub>2</sub>O-, -CH<sub>2</sub>S-.

5 Des intermédiaires de fixation préférés selon l'invention sont de formule (30bis) :



dans laquelle :

- $\text{R}^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- 10 •  $\text{R}^{15}$  représente une fonction réactive nucléophile ou électrophile, en particulier  $\text{COOH}$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{SH}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{O}-\text{NH}_2$ , alkylcétone, aldéhyde, isocyanate, isothiocyanate, maléimide, halogénure d'alkyle, ester de N-hydroxysuccinimide, tosylate.
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- 15 • A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u est un nombre entier compris entre 0 et 2, préférentiellement de 0 ou 1, et
- -Y-X- représente -CONH-, -NHCO-, -CH<sub>2</sub>O-, -CH<sub>2</sub>S-.

20

Un troisième mode de réalisation du support solide consiste à disposer d'un support solide comprenant une première fonction réactive nucléophile ou électrophile, comme par exemple  $\text{NH}_2$ ,  $\text{SH}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{O}-\text{NH}_2$ , alkylcétone, aldéhyde, isocyanate, isothiocyanate, maléimide, halogénure d'alkyle, ester de N-hydroxysuccinimide, tosylate, puis à faire réagir un

25 intermédiaire de fixation, de formule (30) ou (30 bis) décrites ci-dessus, dont la fonction  $\text{R}^{15}$  est complémentaire de la première fonction réactive du support solide. Cette réaction entre le support solide et l'intermédiaire de fixation s'effectue en présence, éventuellement, d'un

agent de couplage pour former une liaison covalente.

Un tel support solide comprenant au moins une fonction diazométhyle, selon les  
5 différents modes de réalisation décrits ci-dessus, en particulier un support solide sur lequel est  
fixé indirectement un réactif de marquage de l'invention, est aussi un objet de la présente  
invention ainsi que le support solide comprenant des acides nucléiques fixés sur le support  
solide par l'intermédiaire des fonctions diazométhyles.

10 Une première application d'un tel support solide est la fabrication de puces à ADN.  
Des méthodes existent pour répartir des acides nucléiques sur le support solide en des  
positions discrètes et prédéterminées.

Le brevet US-A-6,110,426 propose une méthode pour réaliser ces puces à ADN à  
l'aide d'un capillaire que l'on met en contact sur une surface solide pour délivrer un volume  
15 contrôlé de liquide. Un contact effectif a lieu entre l'extrémité du capillaire et le support  
solide pour que la goutte se dépose par capillarité. De même, le brevet US-A-6,083,763 décrit  
un ensemble de capillaires coulissant dans un dispositif de façon à compenser les différences  
de hauteur de chacun d'eux. Ils sont amenés au contact d'une surface plane pour le dépôt par  
capillarité d'oligonucléotides spécifiques.

20 Le brevet US-A-6,083,762 propose une système de répartition de gouttes comprenant  
un microdispenseur couplé à un transducteur piézo-électrique pour éjecter des volumes de  
goutte inférieurs au nanolitre sur une surface solide. Un résultat semblable est obtenu en  
appliquant une source chaude sur la paroi d'un capillaire pour former une bulle qui éjecte un  
volume défini de solution (voir T. Okamoto et al., Nature Biotechnology, 18, p438-441,  
25 2000).

La fonction diazométhyle permet ainsi de greffer de manière covalente les acides  
nucléiques sur le support. Le greffage est simple, la liaison est stable, par rapport à  
l'adsorption notamment, et la sélectivité de la réaction par rapport au phosphate terminal  
permet de réaliser un couplage orienté de l'acide nucléique sur le support solide, ce qui facilite  
30 d'autant les étapes d'hybridation ultérieures en diminuant l'encombrement stérique.

Une deuxième application d'un support solide selon l'invention est la purification des acides nucléiques.

Dans le cas de la purification, cette purification est soit directe (le support solide porteur de fonctions diazométhyle réagit avec les acides nucléiques à purifier) soit indirecte (des acides nucléiques de capture sont fixés sur le support solide). Ces acides nucléiques de capture sont suffisamment complémentaires de la cible à capturer pour s'hybrider avec le degré de spécificité souhaité et c'est le complexe « acides nucléiques de capture/support solide » qui permet la purification des acides nucléiques cibles.

Le support solide est de préférence sous forme dispersée pour l'utilisation en purification comme des particules de latex, par exemple des particules magnétiques.

Par « étape de purification », on entend notamment la séparation entre les acides nucléiques des micro-organismes et les constituants cellulaires relargués dans l'étape de lyse qui précède la purification des acides nucléiques. Ces étapes de lyse sont bien connues à titre d'exemple indicatif, on peut utiliser les méthodes de lyse telles que décrite dans les demandes de brevet :

- WO-A-00/60049 sur la lyse par sonication,
- WO-A-00/05338 sur la lyse mixte magnétique et mécanique,
- WO-A-99/53304 sur la lyse électrique, et
- WO-A-99/15621 sur la lyse mécanique.

L'homme du métier pourra utiliser d'autres méthodes de lyse bien connues telles que les chocs thermiques ou osmotiques ou les traitements par des agents chaotropiques, tels que les sels de guanidium (brevet US-A-5,234,809).

Cette étape permet généralement de concentrer les acides nucléiques. A titre d'exemple, on peut utiliser des particules magnétiques (voir à ce sujet les brevets US-A-4,672,040 et US-A-5,750,338), et ainsi purifier les acides nucléiques, qui se sont fixés sur ces particules magnétiques, par une étape de lavage. Cette étape de purification des acides nucléiques est particulièrement intéressante si l'on souhaite amplifier ultérieurement lesdits acides nucléiques. Un mode de réalisation particulièrement intéressant de ces particules magnétiques est décrit dans les demandes de brevet WO-A-97/45202 et WO-A-99/35500.

Le terme "support solide" tel qu'utilisé ici inclut tous les matériaux sur lesquels peut être fixé un acide nucléique. Des matériaux de synthèse, ou des matériaux naturels, éventuellement modifiés chimiquement, peuvent être utilisés comme support solide, notamment les polysaccharides, tels que les matériaux à base de cellulose, par exemple du papier, des dérivés de cellulose tels que l'acétate de cellulose et la nitrocellulose, ou le dextran ; des polymères, des copolymères, notamment à base de monomères du type styrène, des fibres naturelles telles que le coton, et des fibres synthétiques telles que le nylon ; des matériaux minéraux tels que la silice, le quartz, des verres, des céramiques ; des latex ; des particules magnétiques ; des dérivés métalliques, des gels, etc. Le support solide peut être sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une membrane, d'une particule ou d'une plaque sensiblement plane de verre ou silicium ou dérivés.

L'invention concerne enfin un procédé de capture d'acides nucléiques comprenant les étapes suivantes :

- on dispose d'un support solide sur lequel est fixé directement ou indirectement au moins une molécule comprenant une fonction diazométhyle,
- on met en contact un échantillon biologique susceptible de contenir des acides nucléiques libres, et
- on lave le support solide où la (ou les) molécule(s) sont fixée(s) de manière covalente au moins à un acide nucléique.

Des informations complémentaires peuvent être trouvées dans une autre demande de brevet de la Demanderesse, déposée le 4 mai 2001 sous le numéro d'enregistrement FR01/06039, ainsi que de son extension internationale déposée le même jour que la présente invention.

Les figures et exemples ci-joints représentent des modes particuliers de réalisation et ne peuvent pas être considérés comme limitant la portée de la présente invention.

La figure 1 représente les formules développées de différents réactifs utilisés dans la présente invention ainsi que l'abréviation les désignant. (o- signifie *ortho*, m- *méta* et p- *para*)

Les figures 2A à 2I représentent les profils en fonction du temps analysés par électrophorèse capillaire du couplage covalent de différents réactifs portant une fonction diazométhyle sur l'uridine 3' monophosphate (3'-UMP) selon l'exemple 6.1 :

- 5 • PDAM en figure 2A,
- DPDAM à 2 millimoles par litre (mM) en figure 2B,
- DPDAM à 20 mM en figure 2C,
- PMDAM en figure 2D,
- NPDAM en figure 2E,
- 10 • BioDPDAM en figure 2F,
- *mé*ta-BioPMDAM en figure 2G,
- *para*-BioPMDAM en figure 2H, et
- *ortho*-BioPMDAM en figure 2I.

15 Les figures 3A à 3D représentent les profils en fonction du temps analysés par électrophorèse capillaire de la réaction du *mé*ta-BioPMDAM sur quatre (4) nucléotides 3'-monophosphate selon l'exemple 6.2 :

- 3'-CMP en série ribonucléotide selon la figure 3A,
- 3'-AMP en série ribonucléotide selon la figure 3B,
- 20 • 3'-GMP en série ribonucléotide selon la figure 3C, et
- 3'-TMP en série désoxyribonucléotide selon la figure 3D.

La figure 4 représente les profils en fonction du temps analysés par électrophorèse capillaire de la réaction du *mé*ta-BioPMDAM sur un dinucléotide 5'-ApUp selon l'exemple 6.3.

25

Les figures 5A à 5D représentent le spectre RMN du proton dans D<sub>2</sub>O des différents conjugués entre le réactif *mé*ta-BioPMDAM et quatre (4) ribonucléotides 3'-monophosphate selon l'exemple 6.4 :

- 30 • 3'-GMP en figure 5A,

- 3'-AMP en figure 5B,
- 3' CMP en figure 5C, et
- 3' UMP en figure 5D.

5            La figure 6 représente un schéma de synthèse d'un réactif de marquage portant deux (2) biotines pour l'amplification chimique du signal.

             La figure 7 représente le mécanisme de fragmentation en milieu acide par la formation de site abasique.

10

             La figure 8 montre selon l'exemple 16.1 la cinétique de dégradation à pH acide pour différents nucléosides modifiés (8-bromo-2'-désoxyadénosine (8-BrdA) et la 5-bromo-2'-désoxyoxycytidine (5-BrdC)) ainsi que les quatre (4) nucléosides naturels (dA, dC, dG et dT).

15            Les résultats sont représentés sous forme de pourcentage d'hydrolyse du nucléoside de départ (en ordonnée) par rapport au temps de réaction en minutes (en abscisse).

             La figure 9 représente selon l'exemple 19.2 la cinétique de marquage en fonction du temps à une température de 60°C avec le réactif PDAM sur un oligodésoxynucléotide (ODN) synthétique 5'-phosphate. Les résultats sont représentés sous forme de pourcentage de  
20            marquage par rapport au temps de réaction exprimé en minutes (min) (en abscisse).

             La figure 10 représente selon l'exemple 19.3 le pourcentage de marquage en fonction de la température de réaction. Les résultats sont présentés sur la figure 10 avec en ordonnée le pourcentage de marquage et en abscisse la température de réaction en °C.

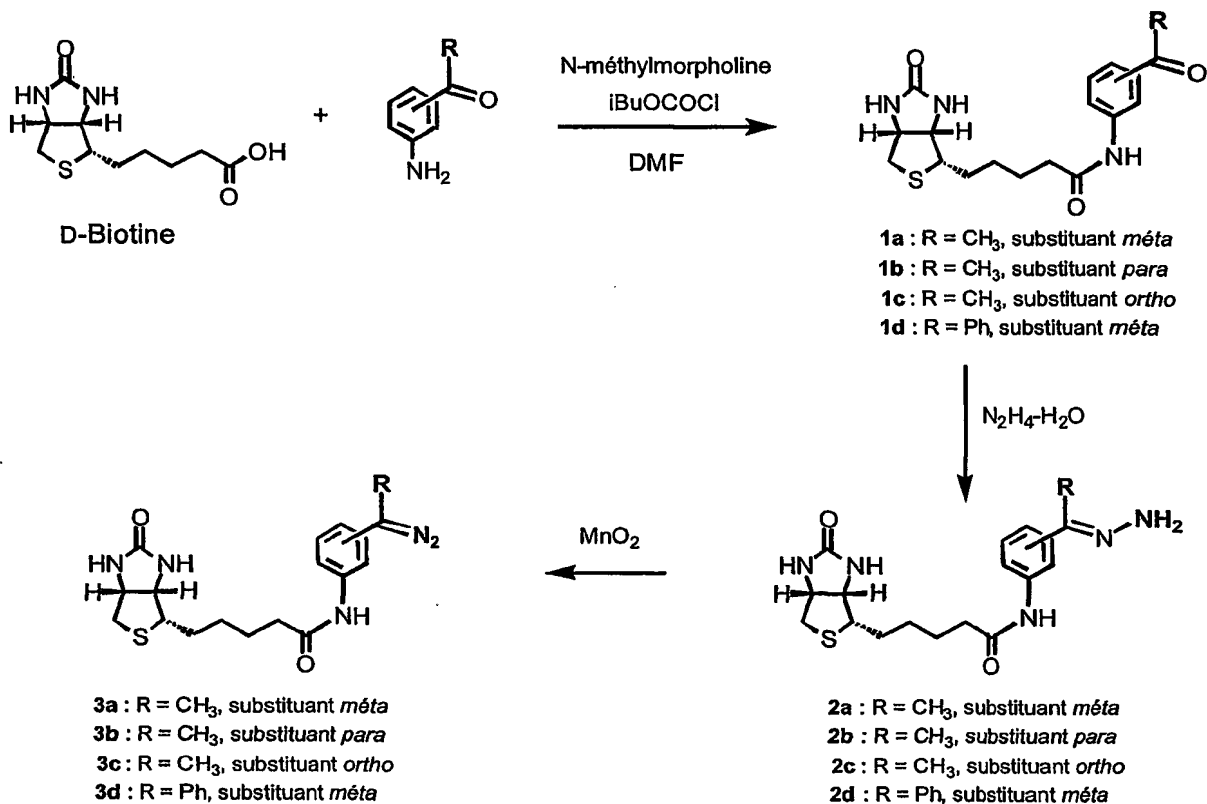
25

             La figure 11 représente une voie de synthèse pour un réactif selon la formule (4') en utilisant le réactif commercial 5-Nitrovanilline. La fonction aldéhyde permet d'obtenir la fonction diazométhyle par formation de l'hydrazone puis oxydation de l'hydrazone par MnO<sub>2</sub>.

30

**Exemple 1 : Synthèse de réactifs avec la biotine :**

Schéma général de synthèse :



5

**Exemple 1.1 : Synthèse du *mé*ta-BioPMDAM :**• Composé biotine *mé*ta-acétophénone 1a :

- 10 On solubilise la D-biotine (1,0 gramme (g), 4,1 millimoles (mmol)) dans 45 millilitres (mL) de DMF anhydre à chaud. On refroidit à 0°C sous argon, puis on ajoute successivement la *N*-méthylmorpholine (590 microlitres (μL), 5,33 mmol) et le chloroformiate d'isobutyle (840 μL, 6,60 mmol). On laisse sous agitation pendant 30 minutes (min), puis on ajoute la 3-aminoacétophénone (824 mg, 6,10 mmol) et la *N*-méthylmorpholine (480 μL, 4,35 mmol) ,
- 15 dans 10 mL de DMF. La solution est maintenue sous agitation à 0°C pendant 2 heures (h), puis on évapore à sec. On reprend le résidu dans 3 mL de MeOH, puis on ajoute 50 mL d'eau.

Le précipité obtenu est filtré, lavé avec de l'eau, du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et de l'éther pour donner 1,2 g (80 %) de produit **1a** brut. Une recristallisation dans le couple MeOH-H<sub>2</sub>O donne **1a** (1,01 g, 70 %) sous forme d'une poudre blanche.

5 F 145°C. - IR (KBr) : 3280, 2931, 2857, 1691, 1590, 1540, 1487, 1434, 1298, 1266  $\text{cm}^{-1}$ . - RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 1,3-1,7 (m, 6 H) ; 2,33 (t,  $J$  = 8 Hz, 2 H) ; 2,55 (s, 3 H) ; 2,58 ; (d,  $J$  = 12 Hz, 1 H) ; 2,83 (dd,  $J$  = 12 et 5 Hz, 1 H) ; 3,13 (m, 1 H) ; 4,15 (m, 1 H) ; 4,31 (m, 1 H) ; 6,34 (s, 1 H) ; 6,41 (s, 1 H) ; 7,44 (t,  $J$  = 8 Hz, 1 H) ; 7,64 (d,  $J$  = 8 Hz, 1 H) ; 7,85 (d,  $J$  = 8 Hz, 1 H) ; 8,17 (s, 1 H) ; 10,05 (s, 1 H). - MS (FAB/glycérol),  $m/z$ : 362  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

10

• Composé *mé*ta-hydrazone **2a** :

Une solution de **1a** (500 mg, 1,38 mmol) et d'hydrazine monohydrate (200  $\mu\text{L}$ , 4,15 mmol) dans de l'éthanol absolu (8 mL) est chauffée à reflux pendant 2 h. Après refroidissement à  
15 température ambiante, le précipité blanc est filtré, lavé avec de l'eau, puis avec de l'éther et séché. On obtient ainsi 385 mg (74 %) de produit **2a** sous forme d'une poudre blanche.

F 185°C. - IR (KBr) : 3298, 2931, 2857, 1698, 1665, 1626, 1541, 1494, 1470, 1446, 1330, 1265  $\text{cm}^{-1}$ . - RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 1,3-1,7 (m, 6 H) ; 1,98 (s, 3 H) ; 2,26 (t,  $J$  = 8 Hz, 2 H) ; 2,56 ; (d,  $J$  = 12 Hz, 1 H) ; 2,81 (dd,  $J$  = 12 et 5 Hz, 1 H) ; 3,11 (m, 1 H) ; 4,13 (m, 1 H) ; 4,29 (m, 1 H) ; 6,39 (s, 3 H) ; 6,42 (s, 1 H) ; 7,22 (m, 2 H) ; 7,50 (d,  $J$  = 8 Hz, 1 H) ; 7,84 (s, 1 H) ; 9,82 (s, 1 H). - MS (FAB/glycérol),  $m/z$ : 376  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

20

• Composé *mé*ta-diazométhane **3a** :

25

On solubilise **2a** (180 mg, 0,48 mmol) dans 2 mL de DMF. On ajoute alors MnO<sub>2</sub> (340 mg, 3,9 mmol). Après 30 minutes d'agitation à température ambiante, le mélange est filtré à travers un entonnoir fritté contenant de la célite (épaisseur : 0,5 cm) et des tamis moléculaires en poudre 3 Å (0,5cm). Le mélange réactionnel est concentré jusqu'à un volume d'environ 0,5



mL, puis 5 mL d'éther sont ajoutés. Le précipité résultant est filtré, lavé à l'éther puis séché. Le composé **3a** (170 mg, 95 %) est obtenu sous forme d'une poudre rose.

F 160°C. - IR (KBr) : 3278, 2935, 2859, 2038, 1704, 1666, 1605, 1577, 1536, 1458, 1430, 1263 cm<sup>-1</sup>. - RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) δ = 1,3-1,7 (m, 6 H) ; 2,11 (s, 3 H) ; 2,28 (t, *J* = 8 Hz, 2 H) ; 2,57 ; (d, *J* = 12 Hz, 1 H) ; 2,81 (dd, *J* = 12 et 5 Hz, 1 H) ; 3,11 (m, 1 H) ; 4,13 (m, 1 H) ; 4,29 (m, 1 H) ; 6,33 (s, 1 H) ; 6,41 (s, 1 H) ; 6,60 (m, 1 H) ; 7,25 (m, 3 H) ; 9,84 (s, 1 H). ).

### Exemple 1.2 : Synthèse du *para*-BioPMDAM :

#### • Composé biotine *para*-acétophénone **1b** :

On solubilise la D-biotine (1 g, 4,1 mmol) dans 45 mL de DMF anhydre à chaud. On refroidit à 0°C sous argon puis on ajoute successivement la *N*-méthylmorpholine (590 µL, 5,33 mmol) et chloroformiate d'isobutyle (840 µL, 6,60 mmol). On laisse sous agitation pendant 30 min, puis on ajoute la 4-aminoacétophénone (824 mg, 6,10 mmol). La solution est maintenue sous agitation à 0°C pendant 2 h puis on évapore à sec. On reprend le résidu dans 50 mL d'eau. Le précipité obtenu est filtré, lavé avec de l'eau puis avec 50mL de MeOH à chaud. Le précipité blanc est dissous dans du DMF en chauffant puis la solution obtenue est filtrée et lavée au MeOH. Le filtrat est récupéré et évaporé à sec pour donner 888 mg de **1b** (2,46 mmol, 60 %).

F 260°C. - IR (KBr) : 3260, 2930, 2358, 1706, 1673, 1610, 1526, 1401, 1380, 1322, 1257, 1150 cm<sup>-1</sup>. - RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 8,82 (s, 1H, NH-CO) ; 7,57 (d, 2H, *J* = 9 Hz, Ar-H) ; 6,83 (d, 2H, *J* = 9 Hz, Ar-H) ; 6,40 (s large, 1H, NH-CO-NH) ; 6,32 (s large, 1H, NH-CO-NH) ; 4,28 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH-NH) ; 4,12 (m, 1H, CH-CH-NH) ; 3,11 (m, 1H, CH-S) ; 2,80 et 2,55 (système ABX, 2H, <sup>2</sup>*J*<sub>AB</sub> = 5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>AX</sub> = 12 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>BX</sub> = 0 Hz, CH<sub>2</sub>-S) ; 2,35 (t, 2H, *J* = 8 Hz, CH<sub>2</sub>-CO) ; 2,10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ; 1,60-1,34 (m, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>).

• Composé *para*-hydrazone **2b** :

Le composé **1b** (870 mg, 2,4 mmol) est dissous à chaud dans l'éthanol (99 %, 8 mL) puis  
5 l'hydrazine monohydrate (995  $\mu$ L, 19,5 mmol) est ajoutée. La solution est chauffée à reflux  
pendant 3 h. Le précipité blanc obtenu est filtré, lavé avec de l'eau glacée. On obtient ainsi  
820 mg (90 %) de produit **2b** sous forme d'une poudre blanche.

F 305°C. – IR (KBr) : 3281, 3183, 2930, 2857, 1698, 1658, 1593, 1521, 1459, 1401, 1325,  
10 1263, 1187  $\text{cm}^{-1}$ . - RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9,68 (s, 1H,  $\text{NH-CO}$ ) ; 7,52 (s, 4H,  $J$  =  
9 Hz, Ar-H) ; 6,43 (s large, 1H,  $\text{NH-CO-NH}$ ) ; 6,35 (s large, 1H,  $\text{NH-CO-NH}$ ) ; 6,21 (s, 2H,  
 $\text{NH}_2$ ) 4,29 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{-CH-NH}$ ) ; 4,12 (m, 1H,  $\text{CH-CH-NH}$ ) ; 3,12 (m, 1H, CH-S) ; 2,81 et  
2,56 (système ABX, 2H,  $^2J_{\text{AB}}$  = 5 Hz,  $^3J_{\text{AX}}$  = 12 Hz,  $^3J_{\text{BX}}$  = 0 Hz,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ) ; 2,32 (t, 2H,  $J$  = 8  
Hz,  $\text{CH}_2\text{-CO}$ ) ; 1,97 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ; 1,63-1,36 (m, 6H,  $(\text{CH}_2)_3$ ).

15

• Composé *para*-diazométhane **3b** :

On solubilise **2b** (200 mg, 0,53 mmol) dans 10 mL de DMF. On ajoute alors 800 mg de  
 $\text{MnO}_2$ . Après 10 minutes d'agitation, le mélange est filtré à travers une couche mixte Célite  
20 (0,5 cm) - tamis moléculaire (0,5 cm en poudre). Le mélange réactionnel est évaporé à sec  
puis lavé à l'éther et séché. Le composé **3b** (190 mg, 96 %) est obtenu sous forme d'une  
poudre rose.

F 180°C (dec). - IR (KBr) : 3257, 2930, 2857, 2032, 1698, 1597, 1524, 1510, 1455, 1404,  
25 1307, 1259, 1180  $\text{cm}^{-1}$ . - RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10,18 (s, 1H,  $\text{NH-CO}$ ) ; 7,88 (d,  
2H,  $J$  = 6 Hz, Ar-H) ; 7,7 (d, 2H,  $J$  = 6 Hz, Ar-H) ; 6,41 (s large, 1H,  $\text{NH-CO-NH}$ ) ; 6,34 (s  
large, 1H,  $\text{NH-CO-NH}$ ) ; 4,28 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{-CH-NH}$ ) ; 4,12 (m, 1H,  $\text{CH-CH-NH}$ ) ; 3,11 (m,  
1H, CH-S) ; 2,80 et 2,55 (système ABX, 2H,  $^2J_{\text{AB}}$  = 5 Hz,  $^3J_{\text{AX}}$  = 12 Hz,  $^3J_{\text{BX}}$  = 0 Hz,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ) ;  
2,35 (t, 2H,  $J$  = 8 Hz,  $\text{CH}_2\text{-CO}$ ) ; 2,10 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ; 1,60-1,34 (m, 6H,  $(\text{CH}_2)_3$ ).

30

**Exemple 1.3 : Synthèse de l'*ortho*-BioPMDAM :****• Composé biotine *ortho*-acétophénone 1c :**

5 On solubilise la D-biotine (1 g, 4,1 mmol) dans 45 mL de DMF anhydre à chaud. On refroidit à 0°C sous argon puis on ajoute successivement la *N*-méthylmorpholine (590 µL, 5,33 mmol) et chloroformiate d'isobutyle (840 µL, 6,60 mmol). On laisse sous agitation pendant 30 min, puis on ajoute la 2-aminoacétophénone (824 mg, 6,10 mmol). La solution est maintenue sous agitation à température ambiante pendant 3 h 30 puis on évapore à sec. On reprend le résidu  
10 dans 50 mL d'eau. Le précipité obtenu est filtré, lavé avec de l'eau puis avec 50mL de MeOH à chaud. Le précipité obtenu est filtré, lavé avec de l'eau. Une recristallisation est faite en dissolvant le produit dans du MeOH à chaud et en reprécipitant par addition d'eau. Le précipité est filtré, lavé à l'eau, puis à l'éther pour donner 1,1 g (2,95 mmol, 72 %) de produit 1c brut.

15

F 150°C. - IR (KBr) : 3248, 2930, 2857, 2359, 1691, 1669, 1651, 1582, 1528, 1448, 1354, 1310, 1245, 1161 cm<sup>-1</sup>. - RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 11,24 (s, 1H, NH-CO) ; 8,33 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz, Ar-H) ; 7,97 (d, 2H, *J* = 8 Hz, Ar-H) ; 7,57 (t, 1H, *J* = 7 Hz, Ar-H) ; 7,18 (t, 1H, *J* = 7 Hz, Ar-H) ; 6,44 (s large, 1H, NH-CO-NH) ; 6,35 (s large, 1H, NH-CO-NH) ; 4,30  
20 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH-NH) ; 4,14 (m, 1H, CH-CH-NH) ; 3,12 (m, 1H, CH-S) ; 2,80 et 2,55 (système ABX, 2H, <sup>2</sup>*J*<sub>AB</sub> = 5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>AX</sub> = 12 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>BX</sub> = 0 Hz, CH<sub>2</sub>-S) ; 2,61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ; 2,37 (t, 2H, *J* = 8 Hz, CH<sub>2</sub>-CO) ; 1,62-1,38 (m, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>).

25

**• Composé *ortho*-hydrazone 2c :**

Le composé 1c (500 mg, 1,38 mmol) est dissous à chaud dans l'éthanol (99 %, 8 mL) puis l'hydrazine monohydrate (572 µL, 11,1 mmol) est ajoutée. La solution est chauffée à reflux pendant 50 minutes. La solution est évaporée à sec. Le précipité blanc obtenu est filtré, lavé avec de l'eau puis séché à l'éther. On obtient ainsi 416 mg (11,1 mmol, 80 %) de produit 2c  
30 sous forme d'une poudre blanche.

F 161°C. – IR (KBr) : 3412, 3240, 2930, 2857, 2351, 1706, 1677, 1604, 1590, 1531, 1463, 1444, 1372, 1303, 1270, 1169  $\text{cm}^{-1}$ . – RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  = 11,97 (s, 1H,  $\text{NH-CO}$ ) ; 8,35 (d, 1H,  $J$  = 8 Hz, Ar-H) ; 7,45 (d, 1H,  $J$  = 7 Hz, Ar-H) ; 7,19 (t, 1H,  $J$  = 7,5 Hz, Ar-H) ; 7,04 (t, 1H,  $J$  = 7 Hz, Ar-H) ; 6,61 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ; 6,42 (s large, 1H,  $\text{NH-CO-NH}$ ) ; 6,35 (s large, 1H,  $\text{NH-CO-NH}$ ) ; 4,32 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{-CH-NH}$ ) ; 4,14 (m, 1H,  $\text{CH-CH-NH}$ ) ; 3,12 (m, 1H, CH-S) ; 2,81 et 2,56 (système ABX, 2H,  $^2J_{\text{AB}}$  = 5 Hz,  $^3J_{\text{AX}}$  = 12 Hz,  $^3J_{\text{BX}}$  = 0 Hz,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ) ; 2,31 (t, 2H,  $J$  = 8 Hz,  $\text{CH}_2\text{-CO}$ ) ; 2,09 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ; 1,63-1,36 (m, 6H,  $(\text{CH}_2)_3$ ).

• Composé *ortho*-diazométhane 3c :

10

On solubilise 2c (200 mg, 0,53 mmol) dans 10 mL de DMF. On ajoute alors 800 mg de  $\text{MnO}_2$ . Après 15 minutes d'agitation, le mélange est filtré à travers une couche mixte Célite(0,5cm)-tamis moléculaire(0,5cm en poudre). Le mélange réactionnel est évaporé à sec puis lavé à l'éther et séché. Le composé 3c (130 mg, 65 %) est obtenu sous forme d'une

15

F 110°C. – IR (KBr) : 3248, 2930, 2857, 2367, 2342, 2038, 1699, 1521, 1456  $\text{cm}^{-1}$ . – RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  = 9,37 (s, 1H,  $\text{NH-CO}$ ) ; 7,26-7,00 (m, 4H, Ar-H) ; 6,43 (s large, 1H,  $\text{NH-CO-NH}$ ) ; 6,35 (s large, 1H,  $\text{NH-CO-NH}$ ) ; 4,30 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{-CH-NH}$ ) ; 4,15 (m, 1H,  $\text{CH-CH-NH}$ ) ; 3,12 (m, 1H, CH-S) ; 2,82 et 2,54 (système ABX, 2H,  $^2J_{\text{AB}}$  = 5 Hz,  $^3J_{\text{AX}}$  = 12 Hz,  $^3J_{\text{BX}}$  = 0 Hz,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ) ; 2,24 (t, 2H,  $J$  = 8 Hz,  $\text{CH}_2\text{-CO}$ ) ; 2,12 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ; 1,63-1,37 (m, 6H,  $(\text{CH}_2)_3$ ).

20

**Exemple 1.4 : Synthèse du *méta*-BioDPDAM :**

25

• Composé *méta*-benzophénone 1d :

On solubilise la D-biotine (500 mg, 2,05 mmol) dans 23 mL de DMF anhydre à chaud. On refroidit à 0°C sous argon, puis on ajoute successivement la *N*-méthylmorpholine (295  $\mu\text{L}$ , 2,67 mmol) et le chloroformiate d'isobutyle (420  $\mu\text{L}$ , 3,28 mmol). On laisse sous agitation

30

pendant 30 min, puis on ajoute la 3-aminobenzophénone (605 mg, 3,07 mmol) et la *N*-méthylmorpholine (240  $\mu$ L, 2,17 mmol) dans 7 mL de DMF. La solution est maintenue sous agitation à 0°C pendant 2 h, puis on évapore à sec. On reprend le résidu dans 1 mL de MeOH, puis on ajoute 25 mL d'eau. Le précipité obtenu est filtré, lavé avec de l'eau, puis avec de l'éther pour donner 810 mg (93 %) de produit **1d** brut. Une recristallisation dans le couple MeOH-H<sub>2</sub>O donne **1d** (630 mg, 72 %) sous forme d'une poudre blanche.

RMN <sup>1</sup>H (200MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 10,10 (s, 1H, NH-CO) ; 8-7,39 (m, 9H, Ar-H) ; 6,43 (s large, 1H, NH-CO-NH) ; 6,35 (s large, 1H, NH-CO-NH) ; 4,27 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH-NH) ; 4,13 (m, 1H, CH-CH-NH) ; 3,12 (m, 1H, CH-S) ; 2,84 et 2,55 (système ABX, 2H, <sup>2</sup>J<sub>AB</sub> = 5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>AX</sub> = 12 Hz, <sup>3</sup>J<sub>BX</sub> = 0 Hz, CH<sub>2</sub>-S) ; 2,31 (t, 2H, J = 8 Hz, CH<sub>2</sub>-CO) ; 1,59-1,36 (m, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>).

• Composé *mé*ta-hydrazone **2d** :

On solubilise **1d** (350 mg, 0,83 mmol) dans 5,5 mL d'éthanol absolu puis on ajoute l'hydrazine monohydrate (140  $\mu$ L, 2,48 mmol). La solution est chauffée à reflux pendant une nuit. Après évaporation, le produit est repris dans 1 mL d'éthanol et de l'eau. Le précipité blanc est recristallisé : on le dissout dans un minimum d'éthanol à chaud et l'on ajoute de l'eau jusqu'à apparition d'un léger trouble. Après refroidissement, le précipité obtenu est lavé à l'eau puis séché à l'éther. On obtient ainsi 264 mg (73 %) de produit **2d** sous forme d'une poudre blanche.

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 9,99 (s, 1H, NH-CO) ; 9,80 (s, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 7,54-6,88 (m, 9H, Ar-H) ; 6,26 (s large, 1H, NH-CO-NH) ; 6,21 (s large, 1H, NH-CO-NH) ; 4,28 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH-NH) ; 4,13 (m, 1H, CH-CH-NH) ; 3,12 (m, 1H, CH-S) ; 2,78 et 2,59 (système ABX, 2H, <sup>2</sup>J<sub>AB</sub> = 5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>AX</sub> = 12 Hz, <sup>3</sup>J<sub>BX</sub> = 0 Hz, CH<sub>2</sub>-S) ; 2,27 (t, 2H, J = 8 Hz, CH<sub>2</sub>-CO) ; 1,57-1,36 (m, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>).

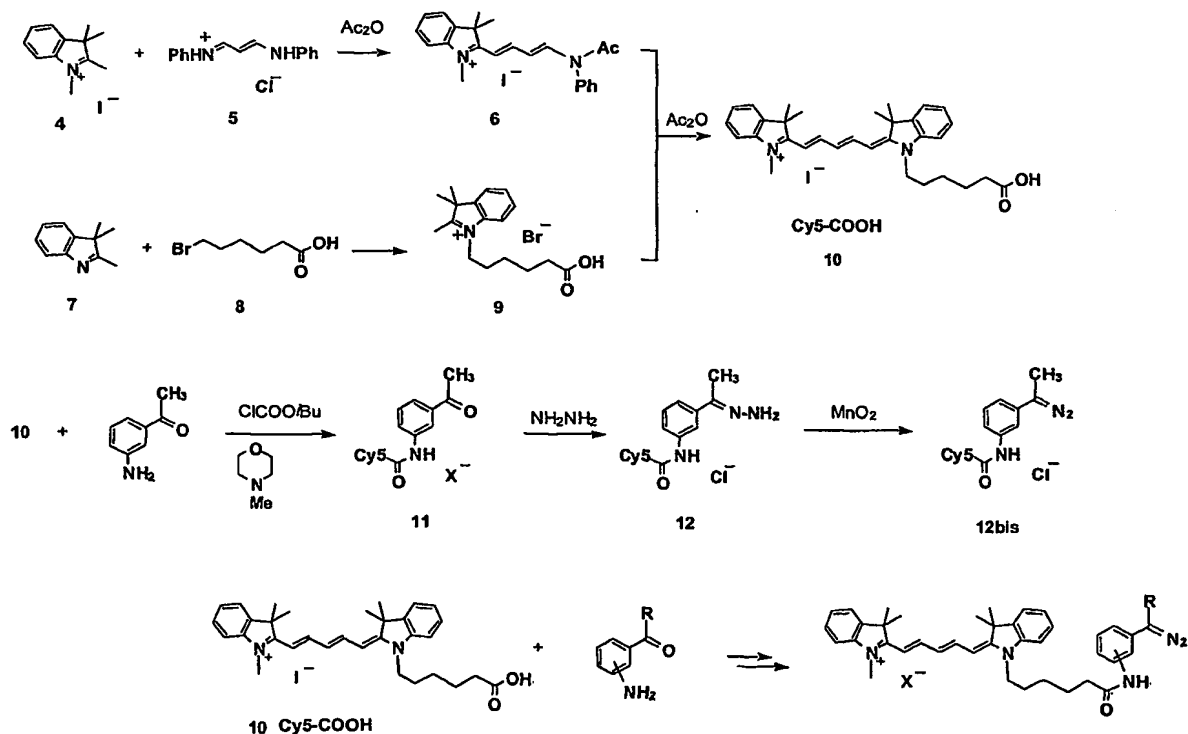
• Composé *mé*ta-diazodiphényl 3d :

On solubilise 3d (500 mg, 0,53 mmol) dans 1 mL de THF. On ajoute alors 80 mg de MnO<sub>2</sub> activé. Après 5 minutes d'agitation à température ambiante, le mélange est filtré à travers une  
 5 couche mixte Célite (0,5 cm) -tamis moléculaire (0,5 cm en poudre). Le mélange réactionnel est évaporé à sec. Le composé 3d (47 mg, 100 %) est obtenu sous forme d'une huile violette.

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 9,95 (s, 1H, NH-CO) ; 7,60-6,9 (m, 9H, Ar-H) ; 6,42 (s large, 1H, NH-CO-NH) ; 6,35 (s large, 1H, NH-CO-NH) ; 4,28 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH-NH) ; 4,14  
 10 (m, 1H, CH-CH-NH) ; 3,12 (m, 1H, CH-S) ; 2,83 et 2,59 (système ABX, 2H, <sup>2</sup>J<sub>AB</sub> = 5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>AX</sub> = 12 Hz, <sup>3</sup>J<sub>BX</sub> = 0 Hz, CH<sub>2</sub>-S) ; 2,27 (t, 2H, J = 8 Hz, CH<sub>2</sub>-CO) ; 1,58-1,35 (m, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>).

Exemple 2 : Réactif de marquage avec le Cy5 : Cy5-PMDAM :

15



• Composé Iodure de 2-[4-(*N*-acétyl-*N*-phénylamino)buta-1,3-diényl]-1,2,3,3-tétraméthyl[3H]indolium 6 :

Le mélange du monochlorhydrate de malonaldehyde-bis(phénylimine) **5** (18,3 g ; 70,0 mmole), de NaOAc (9,0 g ; 110 mmole) et de l'iodure de 1,2,3,3- tétraméthyl[3H]indolium **4** (4,25 g ; 14,1 mmole) dans de l'anhydride acétique (75 mL) est chauffé à 110°C pendant 20 min. Après refroidissement, on ajoute de l'éther (350 mL) et le solide brun précipité est filtré, lavé avec de l'éther (3 × 100 mL). Le solide est redissout dans 150 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, filtré (élimination des sels minéraux) puis évaporé pour donner un solide brun (6,0 g, 90 %).

10 RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ = 8,64 (d ; 1H ; J = 12 Hz ; 1-H) ; 8,14 (t ; 1H ; J = 16 ; 12 Hz ; 3-H) ; 7,63-7,19 (m ; 9H) ; 6,90 (d ; 1H ; J = 15 Hz ; 4-H) ; 5,82 (t ; 1H ; J = 12 ; 13 Hz ; 2-H) ; 4,06 (s ; 3H ; NCH<sub>3</sub>) ; (2,16 (s ; 3H ; -COCH<sub>3</sub>) ; 1,74 (s ; 6H ; CH<sub>3</sub>).

• Composé Bromure de 1-(5-carboxypentyl)-2,3,3-triméthyl[3H]indolium 9 :

15

On mélange le 2,3,3-triméthylindole **7** (10,0 g ; 62,8 mmole) et l'acide 6-bromohexanoïque **8** (12,3 g ; 62,8 mmole) sans solvant et chauffe à 110°C pendant 12 h sous argon. Le mélange réactionnel pâteux rouge-violet est lavé avec de l'acétate d'éthyle (2 × 60 mL, on triture la pâte avec la spatule et on décante le surnageant), puis avec de l'acétone (50 mL, la pâte solidifie).

20 Le solide rose est filtré puis séché sous vide (16,0 g ; 73 %).

• Composé Cy5COOH 10 :

Le mélange de l'iodure **6** (6,0 g ; 12,7 mmole), du bromure **9** (4,5 g ; 12,7 mmole) et de NaOAc (2,6 g ; 32 mmole) dans de l'anhydride acétique (35 mL) est chauffé à 110 °C pendant 20 min. Après refroidissement, on ajoute de l'éther (150 mL) et le précipité est filtré et lavé avec de l'éther (3 × 50 mL). Le solide est dissous dans 100 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, filtré et purifié par chromatographie sur colonne de SiO<sub>2</sub> (éluant : MeOH 5-10 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). On obtient 3,4 g (44 %).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 8,03 (t ; 2H ;  $J$  = 10 ; 11 Hz, 2-H, 4-H) ; 7,38-6,91 (m ; 9H ; Ar-H, 3-H) ; 6,41 (d ; 1H ;  $J$  = 14 Hz ; 1-H) ; 6,31 (d ; 1H ;  $J$  = 13 Hz ; 5-H) ; 4,07 (t ; 2H,  $J$  = 7 ; 7 Hz ;  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 3,68 (s ; 3H ; NCH<sub>3</sub>) ; 2,47 (t ; 2H,  $J$  = 7 ; 7 Hz ;  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,71 (m ; 18H ; CH<sub>3</sub>,  $\beta$ , $\gamma$  et  $\delta$ -CH<sub>2</sub>).

5

• Composé de couplage de la 3-aminoacétophénone avec le Cy5COOH 10 (produit 11) :

À une solution de Cy5COOH 10 (1,19 g ; 1,9 mmole) dans 12 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , on ajoute *N*-méthylmorpholine (360  $\mu\text{L}$  ; 3,2 mmole). La solution est refroidie avec un bain de glace, puis  
10 on ajoute le chloroformiate d'isobutyle (480  $\mu\text{L}$  ; 3,7 mmole). Après 5 minutes d'agitation, on additionne la 3-aminoacétophénone (488 mg ; 3,6 mmole). On agite le mélange à température ambiante pendant 3 h. En ajoutant 250 mL d'éther, on obtient un solide pâteux. Après  
15 agitation, on laisse reposer le solide au fond de ballon et on décante le surnageant. On ajoute de nouveau 50 mL d'éther et on triture avec une spatule pour obtenir un solide. Celui-ci est  
filtré, lavé avec de l'eau, de l'éther, puis séché sous vide. Le produit (iodure) est ensuite  
dissous dans de l'éthanol, passé sur colonne d'amberlite IRA900 ( $\text{Cl}^-$  ; 15 g). La solution  
éthanolique recueillie est évaporée à sec puis passée sur colonne de  $\text{SiO}_2$ . On obtient 0,93 g  
(77 %) de solide bleu.

20 • Composé Cy5-hydrazone 12 :

On ajoute à une solution de l'acétophénone 11 (0,93 g ; 1,46 mmole) dans 5 mL d'éthanol absolu l'hydrazine monohydraté (180  $\mu\text{L}$  ; 3,1 mmole) que l'on agite à température ambiante  
pendant 7 h. On ajoute 50 mL d'éther et le précipité est filtré et lavé avec de l'éther. On dissout  
25 le produit brut dans 50 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , la solution est filtrée puis concentrée à 10 mL. Le produit est précipité par ajout de 100 mL d'éther, filtré, lavé à l'éther et séché sous vide. On obtient 540 mg de produit 12 (57 %).



• Composé Cy5PMDAM 12 bis :

A une solution de 100 mg d'hydrazone 12 dans 2 mL de DMF, on ajoute 300 mg de MnO<sub>2</sub> et l'on agite vigoureusement pendant 10 min. On filtre la suspension à travers une couche de  
5 célite et lave avec DMF (3×500 µL). On ajoute 50 mL d'éther et l'huile déposée est triturée avec une spatule et le surnageant est décanté. On répète l'opération de lavage trois fois avec 25 mL d'éther et le solide ainsi obtenu est filtré, séché. On obtient 65 mg (65 %) de produit 12 bis. La pureté du produit est d'environ 80-85 % (RMN <sup>1</sup>H).

10

Exemple 3 : Autres réactifs synthétisés :

**Exemple 3.1 : Synthèse de *para*-nitrophényldiazométhane (NPDAM) :**

15 Le 4-nitrobenzaldéhyde hydrazone est commercialement disponible (référence 28,118-2, Aldrich, France).

On travaille donc sur 600 mg (3,64 mmole) de ce produit que l'on dissout dans 9 mL de THF. La solution est laissée sous agitation pendant 5 minutes puis 1,26 g (4 équivalent, 14,56 mmole) de MnO<sub>2</sub> sont additionnés avec précaution. Le mélange est laissé sous agitation  
20 pendant 10 minutes, puis filtré. Le filtrat récupéré est évaporé à sec. Après lavage au pentane, le composé *para*-nitrophényldiazométhane est obtenu sous forme d'une poudre orange vif avec un rendement de 79 % (468 mg, 2,87 mmole).

F 80-82°C. - RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 8,11 (d, 2H, J = 9 Hz, Ar-H<sub>3</sub>) ; 7,18 (d, 2H, J = 9 Hz, Ar-H<sub>2</sub>); 6,06 (s, 1H, CH<sub>1</sub>-N<sub>2</sub>).

25

**Exemple 3.2 : Synthèse du phénylméthylidiazométhane (PMDAM) :**

Hydrazone de l'acétophénone : On dilue l'acétophénone (2,0 g, 16 mmole) dans 16 mL  
30 d'éthanol absolu puis on ajoute l'hydrazine (2,3 mL, 48 mmole). On porte au reflux. Après 2 h, on évapore le solvant et on reprend le résidu dans de l'éther (150 mL). On lave avec de

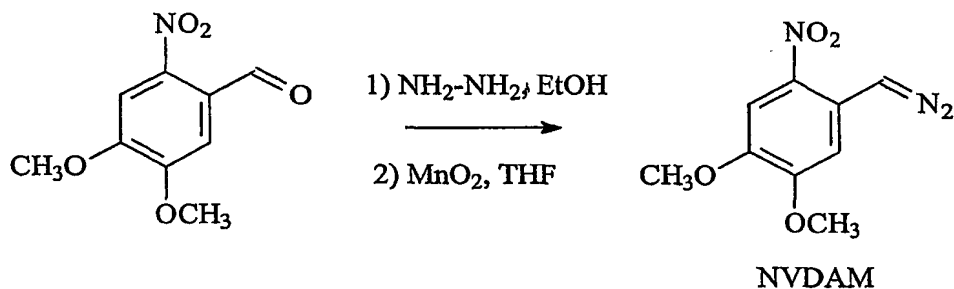
l'eau (100mL). Après séchage sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , on évapore l'éther. On obtient l'huile jaune pâle (1,5 g, 11 mmole, 69 %).

Phénylméthylidiazométhane (PMDAM) : On dissout l'hydrazone (150 mg, 1,1 mmole) dans 3 mL de THF. On ajoute le  $\text{MnO}_2$  (480 mg, 5,5 mmole). On agite pendant 30 min à température ambiante. Le milieu se colore en rouge. On filtre et on évapore le solvant. On obtient l'huile rouge (145 mg, 100 %). Ce réactif est utilisé sans purification.

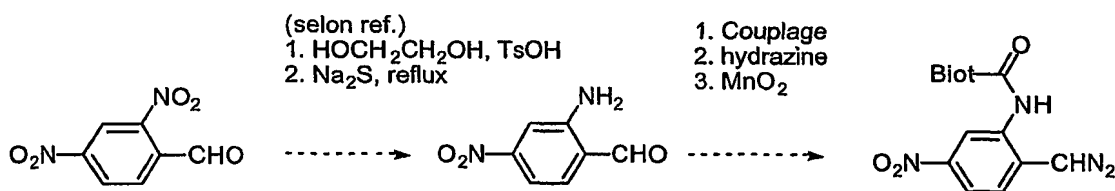
**Exemple 3.3 : Synthèse du diphenyldiazométhane (DPDAM) :**

La Benzophénone hydrazone est commerciale (référence B 960-2 Aldrich, France). On travaille donc sur 196 mg (1,0 mmole) que l'on dissout dans 5 mL de THF. 435 mg (5 éq, 5,0 mmole) de  $\text{MnO}_2$  sont additionnés, le mélange est laissé sous agitation pendant 10 minutes, puis filtré. Le filtrat récupéré est évaporé à sec. On obtient 193 mg (0,99 mmole). Ce réactif est utilisé sans purification.

**Exemple 3.4 : Synthèse du NVDAM :**



La synthèse est réalisée selon le protocole décrit précédemment à partir de 6-nitrovératraldéhyde (Aldrich, référence 27,960-9).

**Exemple 4 : Synthèse du dérivé biotinylé à partir du NPDAM :**

M. E. Wall et al., *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 2689.

- 5 Le dérivé 2-amino-4-nitro benzaldéhyde est préparé selon la méthode de ME Wall et al référencé ci-dessus.

La préparation du diazométhane NPDAM est identique à celle décrite dans l'exemple 3.1 ci-dessus.

10

**Exemple 5 : Préparation des acides nucléiques ADN et ARN :****Exemple 5.1 : Préparation des amplicons ADN :**

- 15 Les amplicons ADN sont générés par PCR à partir de cibles d'ADN génomique *Mycobacterium tuberculosis* 16S ( $10^{+4}$  copies comme cibles de départ) en utilisant le kit Fast Start de Roche, 0,2 mM de chaque désoxyribonucléotide (d-ATP, d-CTP, d-GTP, d-TTP), 0,3  $\mu\text{M}$  d'amorces et 0,4  $\mu\text{L}$  d'enzyme.

Les paramètres de la PCR sont les suivants :

- 20 - 95°C : 4min puis 35 cycles (95°C : 30 sec ; 55°C : 30 sec ; 72°C : 30 sec) puis 4°C .

Les amplicons sont analysés qualitativement par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%, TBE 0,5X). Le volume déposé est de 5  $\mu\text{L}$  et la migration s'effectue durant 20min à 100 Volts (V).

La visualisation des produits PCR est réalisée sous lampe UV après coloration au bromure d'éthidium.

- 25 Les conditions pour la culture, l'extraction des Mycobactéries ainsi que les amorces d'amplification sont données dans la demande de brevet WO-A-99/65926.

**Exemple 5.2 : Préparation des ARN transcrits :**

Les transcriptions sont réalisées à partir de cible PCR (fragment de l'ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*) en utilisant le kit MEGAscript d'Ambion : 7,5 mM de chaque nucléotide (ATP, CTP, GTP et UTP) et 2 µL d'enzyme (ARN polymérase). Le temps d'incubation est de 3 heures (h) à 37 °C. Les amorces d'amplification de la PCR portent un promoteur de polymérase T3 ou T7, comme décrit dans la demande WO-A-99/65926 ou dans l'article J. Clin Microbiol. 37(1), p 49-55, 1999, ce qui permet de réaliser la transcription.

Les transcrits sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5% ; TBE 0,5X). Le volume déposé est de 5 µL et la migration s'effectue durant 20min à 100V. La visualisation des transcrits est réalisée sous lampe UV après coloration au bromure d'éthidium.

Des résultats identiques du point de vue de l'invention peuvent être obtenus en utilisant d'autres techniques d'amplification comme la NASBA ou TMA, qui génèrent directement des amplicons ARN.

**Exemple 6 : Réactivité des réactifs de marquage sur des nucléotides modèles :**

La synthèse des réactifs de marquage est décrite dans les exemples 1 à 4. Le PDAM décrit dans la présente invention est commercialement disponible (référence P1405, Molecular Probes, Eugene, OR).

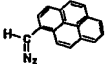


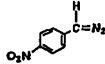
**Exemple 6.1 : Marquage des monomères UMP 3'-phosphate :**

La réactivité des réactifs de marquage portant une fonction diazométhyle a été étudiée pour contrôler la spécificité de la réaction.

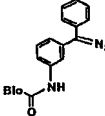
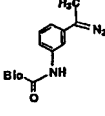
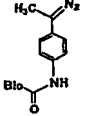
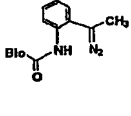
Un protocole a été mis au point qui consiste à étudier cette réactivité par électrophorèse capillaire sur un composé modèle le 3'-UMP (Uridine 3'monophosphate, référence U1126 Sigma) dans les conditions standards suivantes :

3'-UMP 0,04 mM ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2,0 mM ; Marqueur 2,0 mM [ajouté avec un solvant organique approprié (THF, AcOEt ou DMSO)] ; Solvants  $\text{H}_2\text{O}$  -  $\text{CH}_3\text{CN}$  -Solvant organique (rapport : 1/3/1).

- 5 On répartit cette solution en dix fractions de 250  $\mu\text{L}$  que l'on chauffe à 60 °C. Après une durée définie, chaque fraction est traitée avec 250  $\mu\text{L}$  de dichlorométhane. Après agitation, on élimine la phase organique (phase inférieure). On répète cette opération encore deux fois. Après centrifugation (5 min, 5000 tours par minutes (rpm)), la phase aqueuse est analysée par électrophorèse capillaire. Les conditions de l'électrophorèse capillaire (EC) sont les
- 10 suivantes : l'analyse EC a été effectuée par l'appareil Beckman P/ACE 5000. Un capillaire de silice fondue non traité (75  $\mu\text{m}$   $\times$  50 cm) a été utilisé. Le voltage appliqué est de 30 kV (polarité normale) et la température du capillaire a été maintenue à 23°C. Les électrophorégrammes ont été enregistrés à 254 nm. La solution tampon borate (0,1 M, pH 8,3) a été préparée à partir de l'acide borique en ajustant le pH avec une solution NaOH et filtrée à
- 15 travers un filtre 0,2  $\mu\text{m}$ . Les échantillons ont été injectés sous pression (0,5 psi, 5 secondes). Chaque analyse est précédée de la régénération du capillaire par passages successifs d'une solution de NaOH (0,1 M, 2 min), eau (2 min) et de tampon borate (2 min) sous pression (20 psi).
- 20 La réaction est effectuée en faisant varier le temps de réaction entre 0 et 4 heures, comme indiqué sur chaque figure, et les résultats sont présentés pour chaque réactif testé sur les figures 2A à 2I avec la concentration en réactif utilisé.
- Le temps de réaction est indiqué sur chaque électrophorégramme.
- Avec tous les réactifs testés, on obtient la formation exclusive d'un produit monoalkylé, ce
- 25 qui prouve la spécificité de la réaction.
- La réactivité, c'est-à-dire le temps de demi réaction du réactif sur le 3'-UMP, peut être ainsi calculée, par comparaison de la hauteur des pics, et les résultats sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous (conditions standards décrites ci-dessus) :

Formules chimiques et noms	 PDAM	 DPDAM	 PMDAM	 NPDAM
Réactivité	5 min	20 h	30 min	4 h

Formules chimiques et noms	 BioDPDAM	 <i>m</i> -BioPMDAM	 <i>p</i> -BioPMDAM	 <i>o</i> -BioPMDAM *
Réactivité	10 h	15 min	5 min	1 min

\* Avec le *o*-BioPMDAM, la réactivité est estimée car dans les conditions de concentration de 2 mM en réactif de marquage, la réaction est complète en moins de 5 min. La figure 2I utilise donc une concentration de 0,2 mM.

5 **Tableau 1 : Réactivité (temps de demi réaction) de réactifs**

On peut néanmoins noter que, la réaction étant très spécifique et ne conduisant pas à des sous produits pour tous les réactifs testés, il est possible d'augmenter la concentration du réactif de marquage sans conséquence du point de vue de la sélectivité sur le marquage.

- 10 Ainsi pour le réactif DPDAM, si l'on augmente la concentration à 20 mM (voir figure 2C), la réactivité (temps de demi réaction) est de 2 heures. Le même résultat est obtenu avec le BioDPDAM (figure 2F) où la réactivité est de 45 min à une concentration de 30 mM.

#### Exemple 6.2 : Test de différents nucléotides 3'-monophosphate :

15

De manière à éviter toute erreur d'interprétation, une étude complémentaire sur le marqueur *mé*ta-BioPMDAM, pris à titre d'exemple significatif, a été effectuée avec les autres nucléotides 3'-monophosphate.

- 20 Les nucléotides testés sont les suivants : 3'-AMP (référence 85,194-9, Aldrich), 3'-GMP (référence 151214, ICN), 3'-CMP (référence C1133, Sigma), 3'-TMP (série désoxyribo) (référence T1008, Sigma). Les électrophorégrammes obtenus avec les différents nucléotides

sont représentés sur les figures 3A à 3D. Les temps de réaction indiqués sur la figure 3A sont identiques pour les figures 3B à 3D.

Quel que soit le nucléotide de départ (série ribo ou désoxyribo), nous observons la formation exclusive et complète du produit alkylé en 130 min à 60°C. Il est important de noter que dans le cas de la guanine (base la plus réactive avec les réactifs alkylants usuels), seul le produit alkylé au phosphate est observé prouvant la très grande sélectivité de la réaction. Cette étude permet également de vérifier que la vitesse de la réaction ne dépend pas de la nature de nucléotide en tant que substrat.

10

#### **Exemple 6.3 : Etude d'un dinucléotide :**

L'alkylation du dinucléotide ApUp (référence A4298, Sigma) a été effectuée avec le *méta*-BioPMDAM afin de vérifier la sélectivité de la réaction vis-à-vis du phosphate terminal par rapport au phosphate internucléotidique. Le suivi de la réaction par électrophorèse est représenté sur la figure 4. Les conditions sont les conditions standards de l'exemple 6.1 déjà décrit.

La formation exclusive d'un seul produit est observée montrant une bonne sélectivité du réactif *méta*-BioPMDAM vis-à-vis du phosphate terminal par rapport au phosphate internucléotidique.

#### **Exmple 6.4 : Caractérisation des adduits avec les 4 nucléotides 3'-monophosphates :**

Pour s'assurer que les produits obtenus provenaient bien d'une alkylation au phosphate, la synthèse des adduits des monophosphates 3'-UMP, 3'-CMP, 3'-GMP et 3'-AMP avec le réactif *méta*-BioPMDAM a été effectuée. La réaction d'alkylation est réalisée à l'échelle préparative comme indiqué ci-dessous. Les adduits, obtenus avec des rendements de l'ordre de 70 % sont purifiés puis étudiés par RMN du proton et du phosphore.

**Protocole de préparation :**

On dissout le 3'-UMP (sous forme de sel disodique ; 9,3 mg ; 21,1  $\mu$ mol) dans 2 mL d'une solution aqueuse 0,1 M de  $H_3BO_3$ , puis on ajoute successivement 2 mL de  $CH_3CN$ , 6 mL de MeOH puis le réactif *mé*ta-BioPMDAM (75 mg ; 0,20 mmol). La réaction est réalisée pendant 2,5 h à température ambiante. Elle est suivie par électrophorèse capillaire. On ajoute 3 mL d'eau, puis l'excès du réactif est éliminé par extraction avec  $CH_2Cl_2$ . La phase aqueuse est évaporée. Le résidu est dissous dans une petite quantité d'eau et purifié par passage sur une colonne de gel de silice en phase inverse (Lichroprep RP-18, Merck ; élution MeOH/ $H_2O$  (20/80)). On obtient 10 mg (69 %) de l'adduit du 3'-UMP.

Les spectres de RMN du proton obtenus pour les adduits du 3'-NMP (N= G, U, C, A) sont présentés sur les figures 5A à 5D. L'identification des adduits a été réalisé par des expériences de RMN à deux dimensions  $^1H/^1H$  (COSY). Deux diastéréoisomères pour chacun de ces adduits dans un rapport 1/1 sont présents.

Un seul pic est présent pour la RMN du phosphore vers 0 ppm (300 MHz,  $D_2O$ ).

Ces expériences démontrent que la réaction est bien spécifique, qu'un seul adduit est observé et que le marquage a bien lieu sur le phosphore. Il n'y a pas de réaction secondaire d'alkylation sur les bases. Les produits de marquage sont donc particulièrement adaptés pour une étape d'hybridation.

**Exemple 7 : Etude de stabilité :****Exemple 7.1 : Stabilité des réactifs de marquage à la température :**

Tous les dérivés du diazométhane, décrit dans le tableau de l'exemple 6.1 ci-dessus, sont conservés à l'état solide dans le congélateur à -20 °C pendant au moins trois (3) mois et aucune perte de réactivité n'est observée.

La stabilité à température ambiante sur la paillasse a été déterminée par RMN  $^1H$  pour les deux réactifs NPDAM et *mé*ta-BioPMDAM. Nous n'avons observé aucune décomposition en laissant le NPDAM pendant un mois sur la paillasse sans précaution particulière. Nous



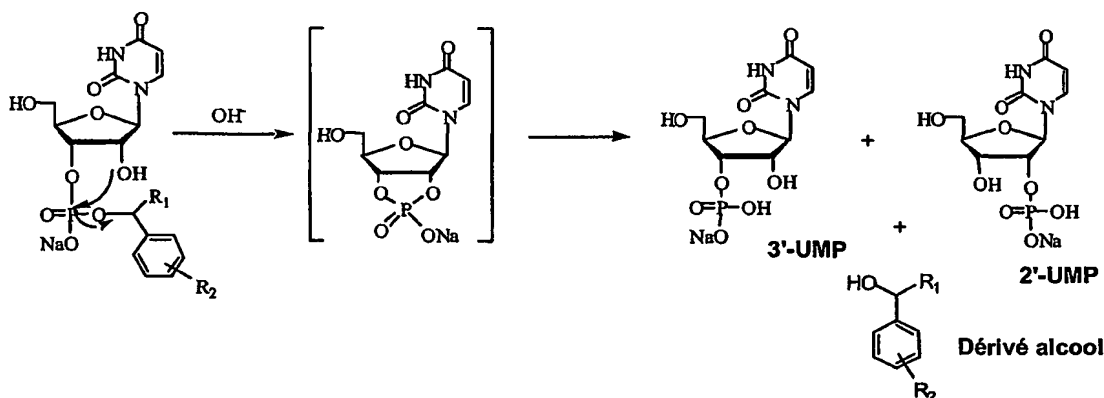
observons environ 50% de décomposition en laissant le *méta*-BioPMDAM sur la paille pendant vingt-cinq (25) jours.

La stabilité à la température du réactif de marquage est une caractéristique essentielle. En effet, la destination finale d'un tel réactif pour une application industrielle est un kit de marquage. Un réactif qui n'est pas stable au moins pendant quinze (15) jours à -20°C, de préférence un (1) mois est invendable. Même s'il existe des moyens de stockage et d'envoi jusqu'à -110°C, il existe une relation entre la stabilité à -110°C et à -20°C et c'est pourquoi la valeur de quinze (15) jours à -20°C, de préférence un (1) mois à -20°C est un minimum industriel. Au delà de -110°C, les laboratoires ne disposent pas des équipements nécessaires (congélateur) pour stocker ces réactifs du point de vue de l'utilisateur et du fabricant, et il n'y a pas de moyen simple type carboglace pour les expédier du point de vue du fabricant.

En ce qui concerne la stabilité à température ambiante, une stabilité de quelques heures, de préférence de un (1) jour, est suffisante pour permettre à l'utilisateur d'effectuer le marquage.

#### Exemple 7.2 : Hydrolyse de différents conjugués Nucléotide 3'-UMP-marqueurs :

Nous avons testé la stabilité des conjugués [3'-UMP-marqueur] en milieu basique. Le mécanisme d'hydrolyse peut être représenté de la manière suivante :



Les différents conjugués utilisés ont été synthétisés selon le protocole suivi pour l'alkylation du monophosphate 3'-UMP (série ribonucléotide) par le *méta*-BioPMDAM.

Les différents réactifs de marquage testés avec le 3'UMP sont :

- *méta*-BioPMDAM,
  - *ortho*-BioPMDAM,
  - *para*-BioPMDAM,
  - DPDAM, et
- 5     • PDAM.

#### Mode Opératoire

On prépare une solution à 20 mM du réactif de marquage dans le DMSO.

Pour la réaction, on mélange :

- 10                     - 20  $\mu$ L de cette solution,  
                          - 40  $\mu$ L de NaOH 1N,  
                          - 10  $\mu$ L de produit de référence à 40 mM, et  
                          - 130  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O.

Cette solution est chauffée à 60°C et des prélèvements à temps précis sont effectués.

- 15     Pour les prélèvements, on opère de la façon suivante :
- 10  $\mu$ L de la solution chauffée,
  - 40  $\mu$ L de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,5M, et
  - 150  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O.

- 20     On injecte alors 15  $\mu$ L de cette solution finale par électrophorèse capillaire, ceci pour chaque prélèvement.

La vitesse de la réaction d'hydrolyse a été déterminée par électrophorèse capillaire en étudiant la diminution de la quantité de conjugué en fonction du temps (mesure de la surface du pic comparée à celle d'un étalon interne : acide 3,5-diaminobenzoïque ou acide naphthoïque).

- 25     De cette façon, nous avons pu comparer la stabilité des différents conjugués.

Les résultats sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous :

Réactif de marquage couplé au 3'UMP	Temps de demi vie du conjugué (min)
<i>méta</i> -BioPMDAM.	197
<i>ortho</i> -BioPMDAM.	30
<i>para</i> -BioPMDAM.	8
DPDAM	54
PDAM	16

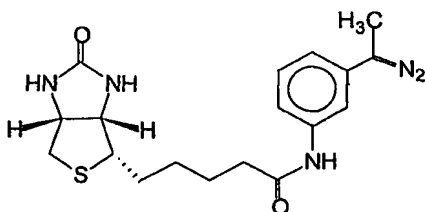
**Tableau 2 : Réactivité (temps de demi réaction) de réactifs conjugués à des nucléotides 3'-UMP-marqueurs**

Ainsi, nous avons trouvé que le conjugué avec le *méta*-BioPMDAM présentait un temps de demi-vie de 197min, soit un temps vingt-cinq (25) fois supérieur à celui du dérivé *para*-BioPMDAM, sept (7) fois supérieur à celui du dérivé DPDAM et quatre (4) fois supérieur à celui du dérivé *ortho*-BioPMDAM.

Les dérivés *ortho* et *méta* permettent de mieux stabiliser le conjugué ce qui permet une meilleure détection dans le cas d'un test diagnostique.

#### **Exemple 8 : Marquage des ARN transcrits par le dérivé *méta*-bioPMDAM (3a) :**

Marquage :



*méta*-bioPMDAM (3a)

Le dérivé *méta*-bioPMDAM (3a) a été obtenu selon le schéma réactionnel décrit dans l'exemple 1.1. Les cibles ARN ont été préparées par transcription post-PCR selon la procédure décrite dans l'exemple 5.2.

- 5 A 50  $\mu$ L d'une solution contenant des ARN transcrits, 9  $\mu$ L d'eau pure (Sigma), 9  $\mu$ L d'imidazole à 0,1M et 9  $\mu$ L de  $MnCl_2$  à 1M ont été ajoutés. La concentration de l'imidazole et du  $MnCl_2$  est de 6mM et 60mM respectivement. Avant l'incubation, de la solution contenant la cible ARN et le tampon nécessaire pour la fragmentation, 3  $\mu$ L de *méta*-bioPMDAM (3a) à 100mM dans le DMSO ont été ajoutés. La concentration finale en marqueur *méta*-  
10 bioPMDAM est de 2 mM. Après avoir complété la solution à 150  $\mu$ L avec de l'eau pure, le mélange réactionnel est homogénéisé et incubé 30min à 60°C.

Après 30min d'incubation et addition de l'EDTA (100mM finale), l'excès de marqueur est éliminé par purification sur colonnes QIAVAC™ (Qiagen, Hilden, Allemagne) en utilisant les tampons et le protocole du fournisseur.

15

#### Hybridation :

- Après l'étape de marquage pendant la fragmentation, les fragments obtenus sont hybridés sur les puces à ADN conçues pour l'analyse de la région 213-415 de la séquence M20940 « Genbank » de l'ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*. Cette puce à ADN est décrite  
20 dans A. Troesch et al, J. Clin Microbiol., 37(1), p49-55, 1999.

Les étapes d'hybridation ont été réalisées sur les stations fluidiques (Affymetrix, santa Clara, CA) en utilisant le protocole d'hybridation et les tampons décrits dans A. Troesch et al, J. Clin Microbiol., 37(1), p49-55, 1999. Une étape supplémentaire est nécessaire pour révéler la biotine (détection indirecte).

25

- Les fragments biotinylés hybridés sur les sondes de capture à la surface de la puce à ADN sont révélés par l'introduction d'une streptavidine marquée par la phycoérythrine (excitation : 488 nanomètres (nm)) et par un Cy5 (excitation : 650 nm) en utilisant les conditions suivantes : 300  $\mu$ L d'eau pure ; 300  $\mu$ L de tampon Tris 100 mM pH 7 / NaCl 1M / tween  
30 0,05% / Antimousse 0,005% ; 6  $\mu$ L de BSA (50 mg/mL) ; 6  $\mu$ L de streptavidine marquée (200  $\mu$ g / mL). Les références des constituants utilisés sont :

- Streptavidine-Phycoérythrine : référence R0438, Dako, Danemark.
- Streptavidine-CY5 : référence C0050 Dako Danemark.
- Antimousse référence M5-575, Ultra Additives Inc.
- Tween référence P-7949, Sigma.

5

Lecture de la puce à ADN :

La lecture de la fluorescence émise à la surface de la puce à ADN, après marquage et hybridation, ainsi que la génération des données en termes d'intensité du signal et du pourcentage d'homologie sont réalisés par les systèmes de lecture et le logiciel fournis par Affymetrix (GeneChip® Instrument System et GeneChip® Information System, Santa Clara CA).

10

Le système de lecture fournit des intensités en signal et bruit de fond exprimées en rfu (« relative fluorescence unit »). Le pourcentage d'homologie est donné par rapport à une séquence référence qui, dans ce cas, est la séquence de *Mycobacterium tuberculosis*.

15

Les résultats en termes d'intensité moyenne du signal (I), du bruit de fond (B) et du pourcentage d'homologie (%) sont donnés dans le tableau 3 ci-dessous.

De manière générale, on considère qu'un pourcentage d'homologie supérieur à 90% est un résultat satisfaisant, bien que l'on cherche en général un résultat supérieur à 95%. Au-dessus de 95%, les valeurs ne sont plus indiquées car elles ne sont pas significatives dans le cas de la puce à ADN Mycobactéries. Une intensité élevée avec un bruit de fond faible est le deuxième résultat recherché dans les exemples qui suivent. Dans tous les résultats, le bruit de fond B est déduit de l'intensité moyenne I.

20

Marqueur	Homologie	I (rfu)	B (rfu)	I/B
Phycoérythrine	>95%	2358	397	6,9
Cy5	>95%	4688	72	66,3

25

Tableau 3 : Lecture de la fluorescence émise à la surface de la puce à ADN après marquage et hybridation

Avec les deux marqueurs, le pourcentage d'homologie est supérieur à 95 %. Les intensités des signaux en rfu sont supérieures à celles obtenues par les techniques de marquage standards.

Ces résultats montrent que la réaction de marquage pendant la fragmentation des ARN transcrits utilisant le dérivé *méta*-bioPMDAM permet de générer suffisamment de fragments  
5 marqués et détectables sur la puce à ADN. La fonction diazométhyle permet donc l'introduction du marqueur biotine dans la séquence d'ARN transcrit. Cette chimie ne modifie pas les propriétés d'interaction biotine-streptavidine. En effet, que ce soit avec le fluorophore phycoérythrine ou le Cy5, les niveaux d'intensités ainsi que le rapport signal sur bruit de fond (I/B) sont bons. Cette technique permet d'utiliser un fluorophore différent en fonction des  
10 applications voire de détecter à deux longueurs d'onde différentes (voir par exemple Nature Genetics volume 14, pages 441-447, 1996).

#### **Exemple 9 : Optimisation des conditions de marquage par le dérivé *méta*-bioPMDAM :**

##### **Exemple 9.1 : Optimisation de la concentration en sel de fragmentation ( $\text{MnCl}_2$ ) :**

Le marquage des ARN transcrits a été réalisé selon le protocole décrit dans l'exemple 8 en utilisant différentes concentrations en  $\text{MnCl}_2$ .

20 L'hybridation et la lecture ont également été réalisées selon les procédures décrites dans l'exemple 8.

Les résultats de marquage montrent que les intensités élevées sont obtenues avec des concentrations faibles en  $\text{MnCl}_2$ .

MnCl <sub>2</sub> : 0 mM,	Intensité I : 3857 rfu,	Homologie : 93,5%,
25 MnCl <sub>2</sub> : 5 mM,	Intensité I : 3031 rfu,	Homologie : 93,5%, et
MnCl <sub>2</sub> : 10mM	Intensité I : 2471 rfu,	Homologie : 94,1%.

L'analyse de la fragmentation des transcrits ARN à différentes concentration en  $\text{MnCl}_2$  montrent que la fragmentation est toujours efficace à 5 mM en métal et en incubant à 60°C.

30 Ceci montre que de très bons résultats de marquage peuvent être obtenus en utilisant les réactifs de marquage dans les conditions optimales de marquage et de fragmentation.

**Exemple 9.2 : Optimisation de la concentration en imidazole :**

5 Quatre (4) tubes contenant 50  $\mu$ L d'une solution d'ARN transcrits (Mycobactéries 16S) sont mis en présence de 4,5  $\mu$ L ou 18  $\mu$ L ou 36  $\mu$ L d'imidazole (1 M dans l'eau pure) respectivement de manière à obtenir 30, 120 et 240 mM en concentration finale. Trois (3)  $\mu$ L de *méta*-bioPMDAM (100 mM dans le DMSO) sont ensuite ajoutés et le volume total est ajusté à 150  $\mu$ L avec de l'eau pure.

10 Les solutions dans les quatre tubes sont mélangées au vortex et mis à incuber 10 minutes à 60°C.

**Purification**

L'élimination de l'excès de marqueur a été effectuée par purification des quatre solutions de réactions de marquage sur des colonnes QIAVAC™.

15 Les étapes d'hybridation et de lecture sont celles de l'exemple 8 (détection streptavidine phycoérythrine).

Les résultats en termes d'intensité du signal sont les suivants :

20 Imidazole 30 mM      intensité 3600 rfu,  
Imidazole 120 mM    intensité 1600 rfu, et  
Imidazole 240 mM    intensité 1400 rfu.

25 Le meilleur résultat en terme d'intensité de marquage est obtenu avec 30 mM en imidazole. Il est probable que les concentrations élevées (120 et 240 mM) engendrent des fragmentations excessives et par conséquent, génèrent des fragments plus courts.

Ceci montre aussi que la chimie de marquage basée sur la fonction diazométhyle peut être optimisée et adaptée aux conditions de marquage et à la cible à marquer.

**Exemple 9.3 : Effet de la concentration en marqueur *méta*-bioPMDAM :**

Six (6) tubes contenant 50  $\mu$ L d'une solution d'ARN transcrits (exemple 5.2) sont mis en présence de 4,5  $\mu$ L d'imidazole (1 M dans de l'eau pure) et de respectivement un volume de  
 5 0,38 ; 0,75 ; 1,5 ; 3 ; 4,5 et 7,5  $\mu$ L de *méta*-bioPMDAM (100 mM dans du DMSO). Le volume total est ajusté à 150  $\mu$ L avec de l'eau pure.

Les solutions sont mélangées par vortex et mises à incuber 10 minutes à 60°C.

Les conditions de purification, d'hybridation et de lecture sont conformes à l'exemple 8.

Les résultats sont donnés dans le tableau 4 ci-dessous :

10

Concentration en <i>méta</i> -bioPMDAM	Marqueur	Homologie (%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
0,25mM	PE	72,4	193	786	0,2
	Cy5	60,5	3263	487	6,7
0,5mM	PE	88,6	454	785	0,6
	Cy5	77,3	7925	589	13,5
1,0mM	PE	91,4	891	809	1,1
	Cy5	84,3	11194	662	16,9
2,0mM	PE	94,6	2361	787	3,0
	Cy5	91,4	15375	417	36,8
3,0mM	PE	95,1	3944	797	5,0
	Cy5	93,5	23248	222	104,8
5,0mM	PE	93,5	6112	820	7,5
	Cy5	92,4	34794	479	72,6

**Tableau 4 :** Tableau récapitulatif des résultats de marquage en fonction des concentrations en marqueur *méta*-bioPMDAM. Révélation sur puce ADN avec de la streptavidine-phycoérythrine (PE) et la streptavidine-Cy5 (Cy5).

15

A partir de 2 mM de *méta*-bioPMDAM, les pourcentages d'homologies et les intensités de marquage sont bons. Ceci est vrai dans le cas de la révélation de la biotine avec la streptavidine portant la phycoérythrine et aussi dans le cas de la streptavidine liée au Cy5. Au



delà de cette concentration, le signal est augmenté et le pourcentage d'homologie n'est pas affecté.

#### Exemple 9.4 : Suppression de l'étape de purification post-marquage :

5

Dans le but de s'affranchir de l'étape de purification, différents volumes de la réaction de marquage sont hybridés sur puce à ADN sans purification préalable.

A 50  $\mu$ L d'une solution d'ARN transcrits (exemple 5.2), le tampon de marquage pendant la  
10 fragmentation est ajouté, le mélange est ensuite incubé 30min à 60°C. Les conditions de marquage pendant la fragmentation sont : 30 mM imidazole (4,5  $\mu$ L d'une solution d'imidazole à 1 M dans l'eau pure), 10 mM  $MnCl_2$  (1,5  $\mu$ L d'une solution de chlorure de manganèse à 1 M dans l'eau pure) et 2 mM de *méta*-BioPMDAM (3  $\mu$ L d'une solution 100 mM dans le DMSO anhydre).

15

Après incubation, différents volumes de la solution de marquage ont été hybridés sur la puce à ADN sans aucune purification préalable. Le protocole d'hybridation utilisé est décrit ci-dessus. Les fragments biotinylés hybridés sur les sondes de capture à la surface de la puce à ADN sont révélés par l'introduction d'une streptavidine marquée à la phycoérythrine (ex : 488  
20 nm) en utilisant les conditions de l'exemple 8.

La détection du marqueur phycoérythrine et l'analyse des résultats ont été aussi réalisés selon le protocole recommandé par Affymetrix et qui est décrit à l'exemple 8.

25 Les résultats sont donnés dans le tableau 5 ci-dessous.

Volume hybridé sur la puce à ADN ( $\mu$ L)	Homologie (%)	I (rfu)	B(rfu)	I/B
20	94,1	932	801	1,2
Réf*.	>95	728	752	1,0

Réf\* : purification post-marquage sur colonnes du volume total de la réaction de marquage.

**Tableau 5 : Suppression de l'étape de purification post-marquage**

Ces résultats montrent qu'avec 2 mM en *méta*-BioPMDAM, il est possible de supprimer la purification si on n'hybride pas la totalité du volume réactionnel. Avec 20  $\mu$ L hybridés sur la puce à ADN, les résultats en termes de pourcentage d'homologie et d'intensité du signal sont comparables à ceux obtenus avec le protocole standard utilisant une étape de purification. Les mêmes résultats, présentés dans le tableau 6, sont obtenus avec des protocoles de marquage sans métal ( $MnCl_2$ ). Les signaux sont plus importants.

Volume hybridé sur la puce à ADN ( $\mu$ L)	Homologie (%)	I (rfu)	B(rfu)	I/B
20	93,5	2057	875	2,3

**Tableau 6 : Suppression de l'étape de purification post-marquage sans  $MnCl_2$** 

Ces résultats montrent aussi que l'utilisation d'autres agents de fragmentation que les métaux peut être une solution pour éviter les précipités et le bruit de fond important.

Dans cet exemple 9.4, les ARN transcrits utilisés sont dégradés, ce qui explique la faiblesse des signaux, mais la référence utilisée permet la comparaison.

#### **Exemple 10 : Autres agents de fragmentation utilisables pour le marquage d'ARN :**

##### **Exemple 10.1 : Utilisation d'une chaîne polyamine :**

Pour s'affranchir des problèmes de diminution du rendement de marquage en présence de sels, nous avons utilisé une polyamine « biogénique », la spermine comme agent de fragmentation. En effet, cette chaîne polyamine est connue pour son interaction avec les phosphates des acides nucléiques.

Cinquante (50)  $\mu\text{L}$  d'ARN transcrits (exemple 5.2) sont incubés 30 minutes à 60 °C avec différentes concentrations de spermine (référence 13275-0010, Acros, FR, solution mère 0,5 M pH 7,5) et 2 mM *mé*ta-BioPMDAM (3  $\mu\text{L}$  d'une solution de BioPMDAM 100 mM dans le DMSO anhydre) dans 150  $\mu\text{L}$  final.

- 5 La purification, l'hybridation et la détection sur puce à ADN ont été réalisées selon le protocole décrit dans l'exemple 8 (détection streptavidine-phycoérythrine).

Les résultats de marquage sont présentés dans le tableau 7 :

Spermine (mM)	Homologie (%)	I (rfu)	B(rfu)	I/B
6	93,0	444	537	0,8
5	94,1	842	552	3,3
4	94,6	1884	461	4,1
1	94,6	2925	449	6,5

10 Tableau 7 : Utilisation de la spermine comme agent de fragmentation

Les résultats de marquage pendant la fragmentation, pourcentage d'homologie et intensité du signal, avec la spermine comme agent de fragmentation sont satisfaisants. Les chaînes polyamines peuvent donc être utilisées pour fragmenter les cibles ARN lors de leur marquage  
15 par les réactifs de marquage portant une fonction diazométhyle.

#### **Exemple 10.2 : Utilisation de dérivés phénanthrolines :**

Essai 1 : A 5  $\mu\text{L}$  de transcrits ARN sont ajoutés 20  $\mu\text{L}$  de phénanthroline- $\text{FeSO}_4$  (référence  
20 P1929, Sigma, 25 mM) et 2  $\mu\text{L}$  de *mé*ta-BioPMDAM (100 mM dans du DMSO). Le volume est ajusté à 100  $\mu\text{L}$ . Le tube est incubé 60min à 95°C.

Essai 2 : A 5  $\mu\text{L}$  de transcrits ARN sont ajoutés 3  $\mu\text{L}$  d'imidazole pH 9,5 (1 M dans de l'eau pure), 0,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MnCl}_2$  et 2  $\mu\text{L}$  de *mé*ta-BioPMDAM (100 mM dans DMSO). Le volume est ajusté à 100  $\mu\text{L}$ . Le tube est incubé 10min à 60°C.

Dans les deux cas, les échantillons sont hybridés, détectés et analysés sur puce à ADN.

Les fragments biotinylés hybridés sur les sondes de capture à la surface de la puce à ADN sont révélés par l'introduction d'une streptavidine couplée à un fluorophore, la phycoérythrine (excitation : 488 nm), comme précédemment.

Conditions	Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
5 mM phénanthroline FeSO <sub>4</sub> , 2 mM <i>méta</i> -bioPMDAM pendant 60 min à 95°C	>95	21821	633	34,5
30 mM Imidazole pH9,5, 10 mM MnCl <sub>2</sub> , 2 mM <i>méta</i> -bioPMDAM durant 10 min à 60°C	>95	10719	540	19,9

Tableau 8 : Utilisation de dérivées phénanthrolines

Les résultats obtenus, dans le tableau 8, avec la phénanthroline comme agent de fragmentation sont supérieurs à ceux obtenus avec le protocole standard utilisant le métal et l'imidazole. D'autres dérivés phénanthrolines complexés avec d'autres métaux que le Fe<sup>++</sup> peuvent être utilisés, par exemple Cu<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, etc.

**Exemple 11 : Marquage et fragmentation en deux étapes d'ARN avec le *méta*-bioPMDAM :**

Cinquante (50) µL d'une solution d'ARN transcrits obtenus selon le protocole décrit dans l'exemple 5.2 sont incubés 30 minutes à 60 °C en présence du tampon de fragmentation : imidazole 30mM et MnCl<sub>2</sub> 10mM. Le dérivé *méta*-bioPMDAM est alors ajouté à une concentration finale de 2 mM et incubé 5 minutes supplémentaires à 60°C.

Avant hybridation, les fragments d'ARN marqués sont purifiés sur colonne selon le protocole décrit précédemment (exemple 8).

Protocole utilisé	Homologie (%)	I (rfu)	B(rfu)	I/B
1. Fragmentation puis marquage	81,1	44245	791	56,0
2. Marquage pendant la fragmentation	91,9	20548	588	35,0

**Tableau 9 :** Marquage et fragmentation en deux étapes d'ARN avec le *méta*-bioPMDAM.

Ici la comparaison, selon le tableau 9, doit être réalisée en tenant compte des intensités et du ratio I/B car les signaux obtenus dans le cas du protocole 1 (fragmentation puis marquage) sont trop forts. On observe une saturation du lecteur, ce qui conduit à des pourcentages d'homologie (81%) plus faibles en comparaison avec 91.9% obtenus avec le protocole de référence.

Néanmoins, cet exemple montre que les étapes de fragmentation et de marquage peuvent être séparées.

#### **Exemple 12 : Amplification du signal pour le marquage d'ARN avec le réactif *méta*-bioPMDAM :**

Le but de cette approche est d'amplifier le signal de fluorescence en introduisant plusieurs fluorophores par molécule de *méta*-bioPMDAM.

#### **Réaction de marquage**

A 5 µL de transcrits (myco 16S), 89 µL d'eau pure (sigma), 30 µL d'imidazole (1 M dans de l'eau pure), 1 µL de MnCl<sub>2</sub> (1 M dans de l'eau pure) et 2 µL de *méta*-bioPMDAM (100 mM dans DMSO) sont ajoutés.

Les tubes sont agités par vortex puis incubés 10 minutes à 60°C.

La purification sur colonne et l'hybridation sur puce à ADN sont réalisées selon le protocole décrit dans l'exemple 8.

Sans amplification du signal

Les fragments biotinylés sont révélés par l'interaction avec de la streptavidine (marquée à la phycoérythrine : PE) avec le réactif de marquage *méta*-bioPMDAM. Le protocole d'addition de la streptavidine sur la puce à ADN est celui décrit dans l'exemple 8.

5

Avec amplification du signal

1<sup>ère</sup> étape : Fixation de streptavidine (300 µL d'eau pure, 300 µL de tampon Tris 100 mM pH 7 / NaCl 1 M / tween 0,05% / Antimousse 0,005% ; 6 µL de BSA à 50 mg / mL ; 4 µL de streptavidine à 1,5 mg / mL).

10

2<sup>ème</sup> étape : Fixation d'anticorps anti-streptavidine biotinylé (300 µL d'eau pure, 300 µL de tampon Tris 100 mM pH 7 / NaCl 1 M / tween 0,05% / Antimousse 0,005% ; 6 µL de BSA à 50 mg / mL ; 3 µL d'anticorps anti-streptavidine biotinylé à 1 mg / mL).

15

3<sup>ème</sup> étape : Fixation de streptavidine marquée la phycoérythrine (300 µL d'eau pure, 300 µL de tampon Tris 100 mM pH 7 / NaCl 1 M / tween 0,05% / Antimousse 0,005% ; 6 µL de BSA à 50 mg / mL ; 6 µL streptavidine marquée la phycoérythrine à 300 µg / mL).

On utilise l'anti-streptavidine biotinylé suivante dans les étapes ci-dessus : référence 216-065-084, Jackson Immuno Research.

20

La lecture des signaux sur la puce à ADN est effectuée selon le protocole décrit dans l'exemple 8. Les résultats en termes de pourcentage d'homologie et d'intensité de marquage sont donnés dans le tableau 10 ci-dessous :

Marquage post-hybridation	Homologie (%)	I (rfu)	B(rfu)	I/B
Sans amplification du signal	>95	2400	581	4,1
Avec amplification du signal	>95	13798	860	16,0

**Tableau 10 :** Amplification du signal pour le marquage d'ARN avec le réactif *méta-bioPMDAM*

5

L'amplification du signal améliore considérablement la sensibilité de détection.

**Exemple 13 : Marquage d'ARN par les dérivés *para*-bioPMDAM (3b) et**

10 ***ortho*-bioPMDAM (3c) :**

Les deux réactifs ont été préparés selon le protocole décrit dans l'exemple 1.2 et 1.3 et ont été évalués dans l'approche de marquage pendant la fragmentation des ARN transcrits.

Les ARN transcrits ont été obtenus selon le protocole décrit dans l'exemple 5.2.

15

Le protocole de marquage, d'hybridation, d'introduction de la streptavidine marquée à la phycoérythrine et le protocole de purification sont ceux décrits dans l'exemple 8.

Les résultats sont donnés dans le tableau 11 ci-dessous :

Molécule utilisée	Homologie (%)	I (rfu)	B(rfu)	I/B
<i>para</i> -bioPMDAM	>95	1665	620	2,7
<i>ortho</i> -bioPMDAM	>95	3657	532	6,9

20

**Tableau 11 :** Marquage d'ARN par les dérivés *para*-bioPMDAM et *ortho*-bioPMDAM

Ces résultats montrent que les substitutions en *ortho* et *para* donnent aussi des résultats intéressants en terme d'intensité de marquage et de pourcentage d'homologie.

5 **Exemple 14 : Marquage des ARN transcrits par un dérivé BioDPDAM (3d) :**

Le dérivé BioDPDAM (3d) a été préparé selon le protocole décrit dans l'exemple 1.4.

Les ARN transcrits ont été obtenus selon le protocole décrit dans l'exemple 5.2.

10 Le procédé marquage et fragmentation est effectué en une étape en comparaison avec le réactif *méta*-BioPMDAM dans les conditions décrites dans le tableau 12 ci-dessous (volume de réaction 100  $\mu$ L).

Le protocole d'hybridation, d'introduction de la streptavidine marquée à la phycoérythrine et le protocole de purification sont ceux décrits dans l'exemple 8.

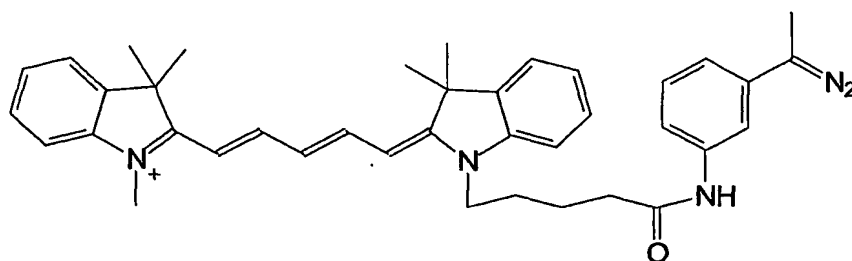
Conditions de marquage	Homologie (%)	I (rfu)	B(rfu)	I/B
<b>Protocole de référence :</b> 30 mM Im pH 9,5 ; 5 mM MnCl <sub>2</sub> ; 2 mM <i>méta</i> -bioPMDAM (3a) ; 10 min à 60°C	89,7	35519	528	67,2
30 mM Im pH 9,5 ; 5 mM MnCl <sub>2</sub> ; 2 mM BioDPDAM (3d) ; 10 min à 60°C	>95	3252	446	7,3
30 mM Im pH 9,5 ; 5 mM MnCl <sub>2</sub> ; 2 mM BioDPDAM (3d) ; 15 min à 60°C	>95	4482	435	10,3
30 mM Im pH 9,5 ; 5 mM MnCl <sub>2</sub> ; 2 mM BioDPDAM (3d) ; 30 min à 60°C	>95	6429	428	15,0

15 Im =Imidazole

**Tableau 12 :** Marquage d'ARN transcrits par le BioDPDAM (3d)

20 Le dérivé 3d donne de bons résultats de marquage des ARN sur le phosphate. Ce résultat montre que des substitutions, telles que le groupement phényle, peuvent être utilisées pour moduler la réactivité et la stabilité des marqueurs portant la fonction diazométhyle.



**Exemple 15 : Marquage d'ARN par le dérivé Cy5-PMDAM, (12bis) :**

Cy5-PMDAM (12bis)

Le marqueur Cy5-PMDAM (12bis) a été préparé selon le protocole décrit dans l'exemple 2.

10 Cinq (5)  $\mu\text{L}$  de transcrit ARN (exemple 5.2) sont marqués par le Cy5-PMDAM dans différentes conditions de fragmentation et de marquage. Les conditions générales sont les suivantes :

- volume final de réaction 100  $\mu\text{L}$ ,
- 30 mM d'imidazole pH 8 (3  $\mu\text{L}$  d'une solution mère à 1 M),
- 15 • 5 mM de  $\text{MnCl}_2$  (6  $\mu\text{L}$  d'une solution mère à 0,1 M), et
- 3 mM du Cy5-PMDAM (3  $\mu\text{L}$  d'une solution mère à 100 mM dans du DMSO anhydre).

Dans un premier essai, le marquage pendant la fragmentation est réalisé en une seule étape.

Dans un deuxième essai, le marquage et la fragmentation ont été réalisés en deux étapes : la  
20 fragmentation est réalisée avant le marquage.

Après chaque incubation ayant contenue du  $\text{MnCl}_2$ , le sel est neutralisé par addition de 20  $\mu\text{L}$  d'une solution à 0,5 M d'EDTA.

L'incubation a été réalisée à 60 °C pendant 30min pour le marquage et la fragmentation en  
25 une étape. Pour le deuxième essai, où le marquage et la fragmentation ont été réalisés en deux étapes, l'incubation, 15min d'incubation, a été utilisée pour chaque étape.

Les fragments marqués ont été purifiés, hybridés et détectés selon le protocole décrit dans l'exemple 8. La seule différence réside dans le fait que lors de l'étape d'hybridation, l'addition de la streptavidine marquée n'est plus nécessaire, car le marqueur est détecté de manière directe par un lecteur approprié (GMS 418 Array Scanner, Affymetrix, Santa Clara, CA).

- 5 Les résultats de marquage sont donnés dans le tableau 13 ci-dessous :

Protocole de marquage	Homologie (%)	I (rfu)	B(rfu)	I/B
Marquage pendant la fragmentation	>95	6612	352	17,3
Fragmentation puis marquage	94,1	8378	158	53,1

Tableau 13 : Marquage d'ARN transcrits par le dérivé de Cy5-PMDAM

- 10 Le marquage sur le phosphate des ARN transcrits par un réactif de marquage (12bis) donne des résultats très satisfaisants en termes d'intensité de marquage et du pourcentage d'homologie.

Il est aussi important de noter que le rapport signal sur bruit de fond est très satisfaisant dans le cas de ce marqueur. En effet, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des dérivés

- 15 cyanines sont éloignées de celles des molécules biologiques.

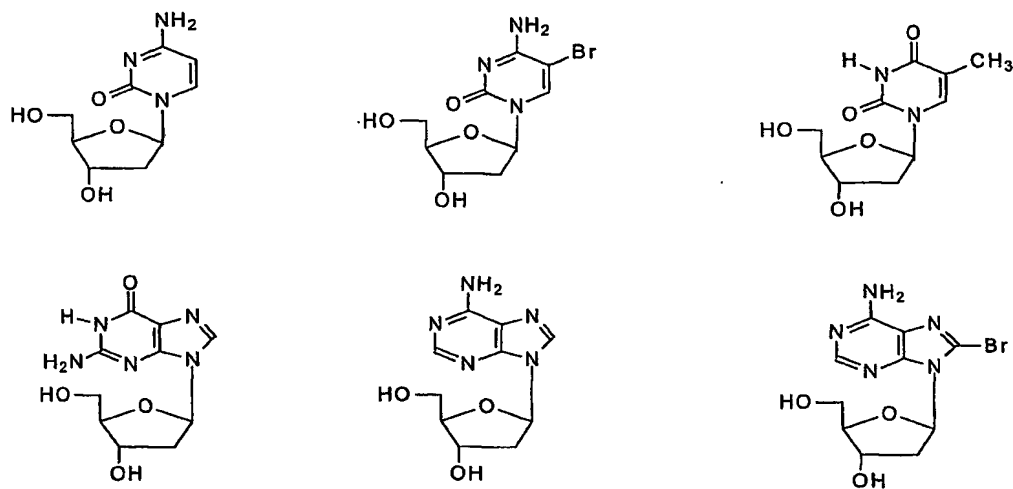
Ces résultats montrent aussi que la fonction diazométhyle permet l'introduction d'autres marqueurs que la biotine au niveau des groupements phosphates des acides nucléiques.

20 **Exemple 16 : Etude de la fragmentation de l'ADN :**

**Exemple 16.1 : Hydrolyse de différents nucléosides en milieu acide :**

Le but de cette étude est de démontrer la différence en terme de stabilité à pH acide entre les nucléosides naturels, les nucléosides modifiés ainsi que les nucléosides de type puriniques et

- 25 pyrimidiniques. Cette étude permet également de mieux contrôler la fragmentation de l'ADN en tenant compte de sa composition en bases.



Deux nucléosides modifiés, la 8-bromo-2'-désoxyadénosine (8-BrdA) et la 5-bromo-2'-désoxycytidine (5-BrdC) ainsi que les quatre (4) nucléosides naturels (dA, dC, dG et dT) ont été utilisés dans cette étude.

50 nanomoles (nmol) de chaque nucléoside sont incubées dans 50 mM de formiate de sodium pH 3 à 95°C. Les temps d'incubation varient de 0 à 45 min. Après séchage sous vide et reprise par 20 µl d'eau pure, les échantillons (10 nmol) sont alors analysés par HPLC en phase inverse. Les résultats sont donnés sous forme de pourcentage d'hydrolyse du nucléoside de départ (en ordonnée) par rapport au temps d'incubation en minutes (en abscisse) voir figure 8.

Les courbes de la figure 8 montrent que la modification de l'adénine en position 8 par un atome de brome rend ce nucléoside moins stable que le nucléoside naturel. D'autre part, les résultats montrent que, dans les conditions utilisées, la dépurination est beaucoup plus importante que la dépyrimidination.

Cette étude montre que la fragmentation de l'ADN par la dépurination ou la dépyrimidination peut être contrôlée en optimisant les conditions d'hydrolyse, ou en incorporant soit des bases modifiées moins stables que les bases naturelles soit des bases pouvant être modifiées et hydrolysées après leur incorporation.

**Exemple 16.2 : Fragmentation de l'ADN double brin incorporant ou non un nucléotide modifié :**

Trois amplifications PCR ont été réalisées en parallèle à partir de cible ADN génomique *Mycobacterium tuberculosis* 16S ( $10^{+4}$  copies de départ) en utilisant le kit *Fast Start* de Roche, 0,2 mM de chaque désoxyribonucléotide (d-ATP, d-CTP, d-GTP, d-TTP), 0,3  $\mu$ M d'amorces et 0,4  $\mu$ L d'enzyme.

Les paramètres de la PCR sont ceux de l'exemple 5.

Dans le premier cas, le protocole est utilisé tel quel : cas de la PCR dite naturelle.

Dans le deuxième cas, le protocole est modifié pour obtenir une PCR à 30 % de 8Br-dATP. Ceci est réalisé en introduisant 0,2 mM de d-CTP, d-GTP et d-TTP. On introduit également 0,14 mM de d-ATP et 0,06 mM de 8-BrdATP. (La 8-BrdATP est commerciale (référence N-2005-1, TriLink Biotechnologies, San Diego CA).

Dans le troisième cas, le protocole est modifié pour obtenir une PCR à 50 % de 8-BrdATP. Ceci est réalisé en introduisant 0,2 mM de d-CTP, d-GTP et d-TTP. On introduit également 0,1 mM de d-ATP et 0,1 mM de 8-BrdATP.

L'étude de la fragmentation seule de ces amplicons a été réalisée dans les conditions décrites ci-dessus : 50 mM de formiate de sodium pH 3 à 95°C.

L'analyse a été effectuée sur gel dénaturant de polyacrylamide (8 % polyacrylamide, 7 M urée, 1 X TBE) utilisant coloration au bromure d'éthidium.

Après 15 min d'incubation à 95 °C dans 50 mM de formiate de sodium pH 3, aucune différence n'est visible entre les trois (3) cibles. Dans tous les cas, nous avons observé une fragmentation totale des amplicons PCR.

La dépurination des amplicons PCR a été également réalisée à différents pH et à différentes températures et temps d'incubation. L'analyse sur gel, dans les conditions ci-dessus, montre qu'à pH 3, la fragmentation est totale après seulement 10 min d'incubation à 95°C. A ce pH, la fragmentation est aussi totale à 60°C après 30 min d'incubation.

A pH 4, 30 min d'incubation sont nécessaires pour l'obtention d'une fragmentation totale des amplicons ADN même à 95°C. Ce résultat est très intéressant et montre que le site abasique

général à pH acide est instable et donc conduit à la fragmentation de la chaîne ADN sans aucun autre traitement particulier.

5 **Exemple 17 : Marquage et fragmentation de l'ADN par le dérivé *méta*-bioPMDAM (3a) en deux étapes :**

Le dérivé *méta*-bioPMDAM (3a) a été obtenu selon le schéma réactionnel décrit dans l'exemple 1.1.

- 10 Les amplicons ADN ont été préparés par amplification PCR selon le protocole décrit dans l'exemple 5.1.

**Marquage**

- 15 A 10 µl de PCR, 38 µL d'eau pure (sigma), 50 µL de formiate de sodium à pH 3 (100 mM dans l'eau pure) sont ajoutés et le mélange est incubé pendant 30 minutes à 60°C. Puis 2 µL de *méta*-bioPMDAM (100 mM dans DMSO) sont ajoutés ensuite. La solution a été mélangée par vortex, puis incubée 15 minutes supplémentaires à 60°C.

Les essais sont réalisés en duplicata afin de pouvoir analyser la fragmentation de l'ADN sur gel et l'efficacité de marquage par hybridation et lecture de la puce à ADN.

20

**Purification**

La purification est réalisée sur colonnes QIAQUICK™ (Nucleotide Removal kit, Qiagen, Hilden, Allemagne). Le protocole de purification utilisé est celui recommandé par le fournisseur.

25

Après purification, l'éluat est transféré dans un tube propre contenant 400 µL de tampon d'hybridation (1,75 mL 20X SSPE ; 2,9 mL Bétaine 5M ; 290 µL DTAB 0,1M ; 10 µL Anti-mousse 30%) sont ajoutés. Les références de ces substances sont, pour :

- 30 • la bétaine référence B-2754 Sigma, et  
• la DTAB référence D-5047 Sigma.

La solution est mélangée par vortex et incubée 10 min à 95°C, afin de séparer les brins d'ADN qui ne sont pas séparés lors de l'étape de marquage pendant la fragmentation (étape de dénaturation). Le tube est ensuite plongé dans un mélange eau-glace à 0°C avant hybridation sur puce à ADN.

5

#### Hybridation sur puce à ADN

Après l'étape de marquage pendant la fragmentation, les fragments obtenus sont hybridés sur les puces à ADN conçues pour l'analyse de la région 213-415 de la séquence M20940 « Genbank » de l'ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*. Cette puce à ADN est décrite dans A. Troesch et al, J. Clin Microbiol., 37(1), p49-55, 1999.

10

Les étapes d'hybridation ont été réalisées sur les stations fluidiques (Affymetrix, Santa Clara, CA) en utilisant le protocole d'hybridation et les tampons décrits dans A. Troesch et al, J. Clin Microbiol., 37(1), p49-55, 1999. Une étape supplémentaire est nécessaire pour révéler la biotine (détection indirecte).

15

L'hybridation est révélée par le couplage de la streptavidine marquée à la phycoérythrine (PE) qui interagit avec la biotine de la *méta*-BioPMDAM dans les conditions suivantes : 300 µL d'eau pure ; 300 µL de tampon Tris 100 mM pH 7 / NaCl 1M / tween 0,05% / Antimousse 0,005% ; 6 µL de BSA (50 mg/mL) ; 6 µL de streptavidine-PE (300 µg / mL).

20

Les références de ces substances sont, pour :

- la Streptavidine-Phycoérythrine : référence : R0438, Dako, Danemark,
- la Streptavidine-CY5 : référence : C0050, Dako, Danemark,
- l'Antimousse référence M5-575, Ultra Additives Inc., et
- le Tween référence P-7949, Sigma.

25

#### Lecture de la puce à ADN :

La lecture de la fluorescence émise à la surface de la puce à ADN après marquage et hybridation ainsi que la génération des données en termes d'intensité du signal et du pourcentage d'homologie sont réalisés par les systèmes de lecture et le logiciel fournis par Affymetrix (GeneChip® Instrument System et GeneChip® Information System, Santa Clara CA).

30

Le système de lecture fournit des intensités en signal et bruit de fond exprimées en rfu (« relative fluorescence unit »). Le pourcentage d'homologie est donné par rapport à une séquence référence qui dans ce cas est la séquence de *Mycobacterium tuberculosis*.

Les résultats en termes d'intensité moyenne du signal (I), du bruit de fond (B) et du pourcentage d'homologie (%) sont donnés dans le tableau ci-dessous :

De manière générale, on considère qu'un pourcentage d'homologie supérieur à 90% est un résultat satisfaisant bien que l'on cherche en général un résultat supérieur à 95%. Au dessus de 95%, les valeurs ne sont plus indiquées car elles ne sont pas significatives dans le cas de la puce à ADN Mycobactéries. Une intensité élevée avec un bruit de fond faible est le deuxième résultat recherché dans les exemples qui suivent. Dans tous les résultats, le bruit de fond B est déduit de l'intensité moyenne I.

#### Analyse sur gel de polyacrylamide

Les échantillons destinés à être analysés sur gel sont séchés sous vide, repris par 10 µL d'eau pure et 10 µL de bleu formamide 2X.

La migration est effectuée sur gel d'acrylamide 8%, dans du TBE 1X, une (1) heure à 150 V.

Le pH acide a été utilisé pour la fragmentation de l'ADN. En effet à ce pH, le phénomène de dépurination engendre des sites abasiques très instables conduisant à une fragmentation presque immédiate des séquences ADN à température élevée. Ce type de fragmentation produit des fragments ADN-5' phosphate.

L'analyse sur gel montre que l'incubation des amplicons PCR à 60°C pendant 30 min en solution dans le tampons formiate (50 mM, pH 3) conduit à une fragmentation totale de ces amplicons. Ceci nous a permis d'évaluer le marquage pendant la fragmentation des amplicons ADN en présence du marqueur *méta*-bioPMDAM.

Les résultats de marquage pendant la fragmentation des amplicons ADN en termes de pourcentage d'homologie, d'intensité des signaux et du bruit de fond sont donnés dans le tableau 14 ci-dessous.

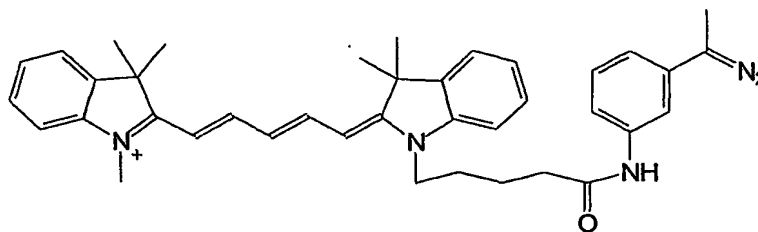
Conditions de marquage des amplicons PCR	Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
Tampon : formiate pH3, 50 mM Marqueur : 2 mM <i>méta</i> -bioPMDAM Incubation : 30 min à 60°C	> 95	4456	593	7,5

**Tableau 14 :** Marquage et fragmentation des amplicons ADN en termes d'homologie, d'intensité des signaux (I) et du bruit de fond (B)

- 5 Cet exemple montre que les dérivés de l'invention peuvent être utilisés pour le marquage des fragments ADN produits par amplification enzymatique dans un protocole en deux étapes. Ils peuvent être également utilisés pour le marquage de l'ADN naturel non amplifié.

10 **Exemple 18 : Marquage de l'ADN par le dérivé Cy5-PMDAM (12bis) :**

Le marquage de l'ADN par ce nouveau marqueur portant le fonction diazométhyle a été évalué en utilisant un fragment ADN synthétique.



Cy5-PMDAM (12bis)

Le réactif de marquage Cy5-PMDAM (12bis) est préparé selon le protocole décrit dans l'exemple 2.

- 20 Un oligodésoxyribonucléotide (ODN) vingt (20) mers est préparé selon la méthode dite au phosphoramidite. On introduit un phosphate à l'extrémité 5' par un réactif de phosphorylation standard compatible avec la chimie au phosphoramidite. La séquence de cet ODN est constituée de toutes les bases naturelles de l'ADN (séquence de l'ODN : 5'-



CTGAACGGTAGCATCTTGAC-3'). Cette séquence est complémentaire de séquences de capture d'une puce à ADN dite « modèle », synthétisée selon la technologie Affymetrix. Cette puce à ADN contient des sondes de capture identiques en séquence et qui sont réparties en damier sur sa surface. La lecture de cette puce à ADN donne des informations quant à la performance du marquage en terme d'intensité mais pas de résultat d'homologie.

Marquage : A 50 picomoles (pmoles) de cet ODN, 10 µL de Cy5-PMDAM (100 mM dans le DMSO) sont ajoutés. Le volume final est de 100 µL. Après homogénéisation, l'incubation est réalisée à 60°C pendant 30 minutes.

Purification et lecture : La purification pour éliminer l'excès de réactif de marquage est réalisée selon l'exemple 17. La lecture sur puce à ADN est effectuée selon l'exemple 17.

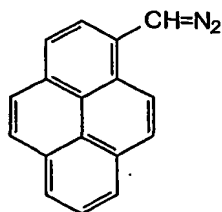
Résultats :

La moyenne des intensités de marquage (I) lue sur la puce à ADN est de 16 644 rfu pour un bruit de fond (B) de 450 rfu.

Ce niveau d'intensité est très élevé et montre que le réactif de marquage Cy5-PMDAM (12bis) est tout à fait compatible avec le marquage des fragments d'ADN sur le groupement phosphate.

**Exemple 19 : Marquage et fragmentation de l'ADN par le réactif PDAM :**

**Exemple 19.1 : Marquage par le 1-Pyrényldiazométhane (PDAM) :**



1-Pyrényldiazométhane

Le PDAM est obtenu chez Molecular Probes (Eugene, OR) et solubilisé dans du DMSO anhydre.

Deux ODN de vingt (20) mers ont été utilisés comme modèles ADN : un ODN de 20mer 5'-hydroxyle et le même ODN de 20mer portant un phosphate à l'extrémité 5'. La séquence de l'ODN est décrite dans l'exemple 18. La réaction de marquage est réalisée dans un mélange à 50 % en DMSO et 1,5 mM en 1-Pyrényldiazométhane (PDAM) à 60°C pendant 30 minutes ou une heure.

L'efficacité du marquage a été évaluée par chromatographie sur couche mince (en phase normale) dans un éluant isopropanol/ammoniaque/eau 60/10/30. Après 30 minutes, le couplage est total sur l'ODN 5'-phosphate. Il faut une heure pour obtenir un couplage partiel sur l'ODN 5'-hydroxyle c'est à dire environ 50%.

Les résultats de l'exemple 6 sont confirmés sur une séquence modèle de 20 bases en ce qui concerne le marquage très préférentiel des réactifs portant une fonction diazométhyle sur le phosphate terminal. Le marquage sur un phosphate intranucléotidique n'est pas un inconvénient rédhibitoire puisque cela peut conduire à une augmentation de la sensibilité par introduction de plus d'un marqueur sur le fragment d'acide nucléique. Cela permet à l'acide nucléique de s'hybrider avec une bonne sensibilité sur la cible complémentaire tout en conservant une bonne spécificité d'hybridation.

L'homme du métier par des réactions d'optimisation peut ainsi contrôler la spécificité du marquage, en jouant par exemple sur le réactif de marquage, le temps de réaction et la température, pour avoir un marquage exclusif sur le phosphate terminal.

#### **Exemple 19.2 : Etude cinétique de la réaction de marquage par le PDAM :**

25

Cette étude a été réalisée en utilisant l'ODN 20mer 5'-phosphate dans les conditions précédentes en faisant varier le temps de réaction. Les rendements de marquage ont été évalués par analyse chromatographie liquide haute pression (CLHP) en phase inverse dans les conditions suivantes :

30 Phase inverse colonne Spheri-5 RP-18 5 µm, 220x 4,6 mm (Perkin Elmer). Les tampons et le gradient utilisés sont :

- Tampon A : 0,1 M TEAA ; Tampon B = 50% Tampon A + 50 % CH<sub>3</sub>CN, et
- Gradient de 10 à 50 % de B en 30 min à 1 ml/min à température ambiante.

Les résultats sont représentés sur la figure 9 avec en abscisse le temps de réaction, exprimé en minutes, et en ordonnée le pourcentage de marquage.

Le rendement est proche de 90% après seulement 10 min d'incubation à 60°C.

#### **Exemple 19.3 : Effet de la température sur le marquage au PDAM :**

- 10 Le marquage a été réalisée en utilisant l'ODN 20mer 5'-phosphate dans les conditions précédentes en faisant varier la température d'incubation et avec un temps d'incubation de 10 minutes dans chaque cas.

Les rendements de marquage ont été évalués par analyse CLHP en phase inverse.

- 15 Les résultats sont présentés sur la figure 10 avec en ordonnée le pourcentage de marquage et en abscisse la température de réaction en °C

Il est très important de noter que même à température ambiante (25°C), nous observons un marquage de l'ODN. Après 10 minutes d'incubation à 25 °C, le rendement de marquage est environ de 25%. A des températures supérieures à 50°C, des rendements supérieurs à 80% sont obtenus.

- 20 Ceci montre l'efficacité et la flexibilité de cette chimie de marquage de l'ADN par les réactifs portant une fonction diazométhyle.

#### **Exemple 20 : Marquage et fragmentation des amplicons ADN obtenus par amplification**

- 25 **PCR avec le réactif de marquage *méta*-bioPMDAM (3a) :**

Le dérivé *méta*-bioPMDAM (3a) a été obtenu selon le schéma réactionnel décrit dans l'exemple 1.1.

- 30 Les amplicons ADN ont été préparés par amplification PCR selon le protocole décrit dans l'exemple 5.1.

**Exemple 20.1 : Comparaison du marquage avec et sans fragmentation :***a. Marquage dans les conditions de fragmentation :*

A 10 µL de PCR sont ajoutés 50 µL de formiate de sodium pH 3 (50 mM) et 2 µL de *méta*-  
 5 BioPMDAM 100 mM dans du DMSO). Le volume est ajusté à 100 µL. La solution est  
 incubée 30 min à 60°C.

*b. Marquage sans fragmentation :*

A 10 µL de PCR sont ajoutés 2 µL de *méta*-BioPMDAM (100 mM dans du DMSO). Le  
 10 volume est ajusté à 100 µL. La solution est incubée 30 min à 60°C.

Le reste du protocole est identique à celui de l'exemple 17.

Résultats

Protocole utilisé	Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
<i>a. Marquage dans les conditions de fragmentation</i>	>95	3995	569	7,0
<i>b. Marquage sans fragmentation</i>	94,1	500	542	0,9

15

Tableau 15 : Comparaison du marquage avec et sans fragmentation

Les résultats dans le tableau 15 ci-dessus montre que sans fragmentation, la moyenne des  
 intensités obtenues est au même niveau que le bruit de fond (500 rfu). Le marquage pendant la  
 20 fragmentation donne un niveau d'intensité bien supérieur (environ 4000 rfu) et un très bon  
 pourcentage d'homologie. La combinaison des deux étapes représente donc bien une  
 amélioration significative pour la détection d'un acide nucléique de longueur supérieure à cent  
 (100) nucléotides.

**Exemple 20.2 : Effet de la dénaturation avant hybridation sur puce à ADN :**

Deux réactions de marquage ont été réalisées en parallèle dans deux tubes séparés selon le protocole suivant : A 10 µL de PCR sont ajoutés 50 µL de tampon formiate de sodium pH 3  
5 (50 mM) et 2 µL de *méta-bio*PMDAM (100mM dans du DMSO). Le volume total est ajusté à 100 µL et incubé 30 min à 60°C.

Après purification sur colonne (exemple 17), la solution issue du premier tube est incubée 10 min à 95°C (afin de désapparier le double brin d'ADN), puis le tube est plongé dans un mélange eau-glace à 0°C jusqu'à l'hybridation sur la puce ADN.

10 La solution issue du deuxième tube est hybridée sur la puce à ADN sans dénaturation préalable.

Les fragments biotinylés hybridés sur les sondes de capture à la surface de la puce à ADN sont révélés par l'introduction d'une streptavidine marquée par la phycoérythrine en utilisant les  
15 conditions décrites dans l'exemple 17.

**Résultats**

Conditions utilisées	Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
<i>Avec dénaturation</i>	>95	22812	570	40,1
<i>Sans dénaturation</i>	93,5	4795	681	7,0

20 **Tableau 16 :** Effet de la dénaturation avant hybridation sur puce à ADN

Les résultats obtenus, présentés dans le tableau 16, avec la dénaturation pré-hybridation sont supérieurs à ceux obtenus sans l'étape de dénaturation. Ceci montre que la dénaturation de l'ADN est nécessaire pour obtenir un bon niveau d'intensité. La fragmentation via les sites  
25 abasiques est un moyen pour faciliter la dénaturation d'un ADN double brin et renforcer l'hybridation sur les sondes de captures.

Pour tester d'autres réactifs de marquage et compte tenu des résultats obtenus avec les différentes conditions ci-dessus, nous avons défini un protocole de référence utilisant la fragmentation au tampon formiate de sodium (50 mM, pH 3) et un étape de dénaturation pré-hybridation.

5

**Exemple 21 : Marquage et fragmentation des amplicons PCR par les réactifs biotinylés dans un protocole en une étape :**

- 10 Les dérivés *méta-*, *ortho-*, et *para*-bioPMDAM ont été préparés selon le protocole décrit dans les exemples 1.1, 1.2 et 1.3. Ils ont été solubilisés dans du DMSO anhydre à une concentration de 100 mM.

Le protocole est identique à celui de l'exemple 20.2 ci-dessus (marquage et fragmentation en une étape puis étape de dénaturation pré-hybridation).

15

**Résultats**

Marqueur	Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
<i>ortho</i> -bioPMDAM	>95	25951	820	31,6
<i>méta</i> -bioPMDAM	>95	22960	581	39,5
<i>para</i> -bioPMDAM	94,1	43785	1205	36,3

**Tableau 17 : Marquage et fragmentation des amplicons PCR par les réactifs biotinylés dans un protocole en une étape**

20

Le protocole optimisé avec fragmentation et marquage en une étape donne d'excellents résultats avec différents réactifs de marquage avec la fonction réactive diazométhyle, comme le montrent les résultats exposés dans le tableau 17.

25

**Exemple 22 : Marquage et fragmentation de l'ADN par le BioDPDAM :**

Les amplicons ADN ont été préparés par amplification PCR selon le protocole décrit dans l'exemple 5.1.

5 La synthèse du réactif de marquage est décrite dans l'exemple 1.

Le protocole est identique à celui de l'exemple 20.2, y compris la dénaturation à 95 °C avant l'étape d'hybridation.

**Résultats**

10

Marqueur utilisé	Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
BioDPDAM	93,0	32359	3610	9,1

**Tableau 18 : Marquage et fragmentation de l'ADN par le BioDPDAM**

15 Ce résultat, décrit dans le tableau 18, montre que des substitutions aussi importantes que le groupement phényle peuvent être utilisées pour optimiser la réactivité des réactifs de marquage portant une fonction diazométhyle.

20 **Exemple 23 : Marquage et fragmentation de l'ADN par la 5-(bromométhyl)fluorescéine :**

Les amplicons ADN ont été préparés par amplification PCR selon le protocole décrit dans l'exemple 5.1.

25 A 10 µL de PCR sont ajoutés 50 µL de formiate de sodium pH3 (100 mM) et 2 µL de 5-(bromométhyl)fluorescéine (Molecular probes, Eugen, OR) (100 mM dans du DMSO). Le volume est ajusté à 100 µL. La solution est incubée 30 min à 60°C.

Les conditions de purification sont conformes à celles de l'exemple 17. Une étape de dénaturation est effectuée comme décrit dans l'exemple 20.2.

Les autres conditions d'hybridation et de lecture sont identiques à celles décrites dans l'article de A. Troesch et al. J. Clin. Microbiol., 37(1), p 49-55 1999. La fluorescéine est directement  
5 détectable sur le lecteur.

Protocole utilisé	Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
<i>Marquage et fragmentation des amplicons PCR avec la 5-(bromo-méthyl)fluorescéine</i>	>95	855	183	4,7

Tableau 19 : Marquage et fragmentation de l'ADN par la 5-(bromométhyl)fluorescéine

10 Ce résultat du tableau 19 montre que la fragmentation de l'ADN par la création de sites abasiques est tout à fait compatible avec un réactif de marquage portant une fonction réactive halogénure d'alkyle. Ce protocole est réalisé en une étape (fragmentation et marquage), mais avec des intensités plus faibles qu'avec les marqueurs portant la fonction diazométhyle.

15

**Exemple 24 : Marquage et fragmentation des amplicons ADN en présence d'un autre agent chimique de fragmentation dérivé de la phénanthroline :**

Des amplicons ADN ont été préparés par amplification PCR selon le protocole décrit dans  
20 l'exemple 5.1. Deux types de conditions sont utilisées :

Conditions a :

A 10 µL de PCR sont ajoutés 20 µL de phénanthroline-FeSO<sub>4</sub> (25 mM) et 2 µL de *méta*-BioPMDAM (100 mM dans DMSO). Le volume total est ajusté à 100 µL. Le mélange est incubé 60 min à 95°C.



Conditions b :

A 10  $\mu$ L de PCR sont ajoutés 50  $\mu$ L de tampon formiate de sodium pH3 (100 mM dans eau pure) et 2  $\mu$ L de *méta*-BioPMDAM (100 mM dans DMSO). Le volume total est ajusté à 100  $\mu$ L. Le mélange est incubé 60 min à 95°C.

5

Les autres conditions du protocole sont identiques à celles de l'exemple 17.

Conditions	Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
Phénanthroline FeSO <sub>4</sub> (5 mM) <i>méta</i> -bioPMDAM (2 mM) 60 min à 95°C	>95	2236	500	4,5
Tampon formiate (50mM) pH3 <i>méta</i> -bioPMDAM (2 mM) 60 min à 95°C	>95	6786	565	12,0

Tableau 20 : Marquage et fragmentation des amplicons ADN en présence de la phénanthroline

10

Les deux conditions de fragmentation permettent un résultat satisfaisant comme démontré dans le tableau 20.

Le meilleur résultat est obtenu avec les conditions (b) utilisant la fragmentation à pH acide.

15

**Exemple 25 : Fragmentation des amplicons PCR marqués par incorporation de d-UTP-fluorescéine :**

Incorporation du nucléotide marqué

20

Une amplification PCR a été réalisée selon le protocole suivant afin générer des amplicons PCR marqués par la fluorescéine (marquage sur les bases).

A partir de cible ADN génomique *Mycobacterium tuberculosis* 16S ( $10^{+4}$  copies) en utilisant le kit *Fast Start* de Roche, 0,2 mM des désoxyribonucléotides d-ATP, d-CTP et d-GTP ainsi

que 0,14 mM de d-TTP et 0,06 mM de d-UTP-12-fluoresceine, 0,3  $\mu$ M d'amorces et 0,4  $\mu$ L d'enzyme. Le pourcentage du nucléotide marqué par rapport à son homologue naturel d-UTP est de 30%. C'est ce rapport qui est généralement utilisé dans les réactions de marquage des amplicons par incorporation de nucléotides marqués.

- 5 La d-UTP-12-fluoresceine est disponible commercialement chez Roche Diagnostics référence 1373242, Mannheim, Allemagne).

Les paramètres de la PCR sont ceux de l'exemple 5.1.

*a. Fragmentation des amplicons PCR marqués à 30% par d-UTP-fluorescéine :*

- 10 A 10  $\mu$ L de PCR sont ajoutés 50  $\mu$ L de tampon formiate de sodium pH 3 (50 mM). Le volume est ajusté à 100  $\mu$ L. La solution est ensuite incubée 30 min à 60°C.

*b. Marquage pendant la fragmentation des amplicons PCR contenant 30% par d-UTP-fluorescéine :*

- 15 A 10  $\mu$ L de PCR sont ajoutés 50  $\mu$ L de tampon formiate de sodium pH 3 (50 mM) et 2  $\mu$ L de méta-BioPMDAM (100 mM dans du DMSO). Le volume est ajusté à 100  $\mu$ L. La solution est ensuite incubée 30 min à 60°C. Cet essai correspond à un protocole de référence qui permet de comparer les différentes stratégies de marquage en s'affranchissant de la variabilité due à l'étape d'amplification.

20

Une étape de purification sur colonne et une étape de dénaturation à 95°C sont effectuées dans tous les cas comme dans l'exemple 17.

*Protocole (a1) :*

- 25 Les acides nucléiques obtenus par fragmentation des amplicons marqués à la d-UTP-fluorescéine (conditions a)) sont hybridés sur puce à ADN et détectés dans un premier temps par lecture directe des signaux fluorescents émis par la fluorescéine comme décrit dans l'exemple 23.

Protocole (a2) :

Une étape d'amplification du signal a été utilisée pour améliorer la sensibilité de marquage. L'amplification du signal a été réalisée par l'introduction, lors de l'étape d'hybridation, d'un anticorps anti-fluorescéine biotinylé (référence 216-065-084, Jackson ImmunoResearch) puis d'une streptavidine marquée par la phycoérythrine en utilisant les conditions successives suivantes :

- 300 µL d'eau pure,
- 300 µL de tampon Tris 100 mM pH 7 / NaCl 1M / tween 0,05% / Antimousse 0,005% , 2,4 µL de BSA (50 mg/mL), 1,2 µL d'anticorps anti-fluorescéine biotinylé. (1 mg / mL),
- 300 µL d'eau pure, et
- 300 µL de tampon Tris 100 mM pH 7 / NaCl 1M / tween 0,05% / Antimousse 0,005% ; 6 µL de BSA (50 mg/mL) ; 6 µL de streptavidine-PE. (300 µg / mL).

Dans ce protocole, la fluorescéine agit comme un haptène (traceur détectable indirectement par un anticorps marqué) et non pas comme un fluorophore.

Protocole (b) :

Les fragments biotinylés (condition *b*) hybridés sur puce à ADN sont révélés par l'introduction d'une streptavidine marquée par la phycoérythrine en utilisant les conditions suivantes :

- 300 µL d'eau pure, et
- 300 µL de tampon Tris 100 mM pH 7 / NaCl 1M / tween 0,05% / Antimousse 0,005% ; 6 µL de BSA (50 mg/mL) ; 6 µL de streptavidine marquée. (300 µg / mL).

La lecture de la fluorescence émise à la surface de la puce à ADN après marquage et hybridation ainsi que la génération des données en termes d'intensité du signal et du pourcentage d'homologie sont réalisés par les systèmes de lecture et le logiciel fournis par Affymetrix. A ce propos, il est important de noter que le système de lecture utilisé contient deux filtres permettant de détecter directement :

- la fluorescéine dans le cas où les amplicons sont marqués au d-UTP-fluorescéine uniquement, selon le protocole *a1*, ou bien

- la phycoérythrine dans le cas où les amplicons sont marqués :
  - au d-UTP-fluorescéine avec amplification du signal, selon le protocole *a2*, ou
  - par le *méta*-bioPMDAM pendant leur fragmentation, selon le protocole *b*.

Dans les deux cas où la révélation s'effectue par la phycoérythrine, l'utilisation d'un filtre permet de s'affranchir du signal généré par la fluorescéine et c'est bien le signal de la phycoérythrine qui est détecté.

### Résultats

Protocole utilisé	Marqueur détecté	Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
<i>a1. Fragmentation des amplicons PCR marqués par la d-UTP-fluorescéine</i>	Flu*	81,6	595	342	1,7
<i>a2. Fragmentation des amplicons PCR marqués par la d-UTP-fluorescéine avec amplification du signal</i>	PE*	>95	22107	3461	6,4
<i>b. Fragmentation et marquage sur les mêmes amplicons PCR modifiés par la d-UTP-fluorescéine et marqués par la méta-BioPMDAM</i>	PE*	>95	21700	1503	14,4

10 \* Flu = Fluorescéine et PE = Phycoérythrine

Tableau 21 : Fragmentation des amplicons PCR marqués par incorporation d-UTP-fluorescéine

- 15 Les résultats, du tableau 21 ci-dessus, montrent que la fragmentation chimique utilisant la création de site abasique est compatible avec le marquage enzymatique des amplicons ADN et que le marquage peut avoir lieu avant la fragmentation.
- Les niveaux d'intensité ainsi que le pourcentage d'homologie obtenus avec ce protocole d'incorporation enzymatique du fluorophore sont faibles en comparaison de ceux obtenus

avec le marquage pendant la fragmentation utilisant le réactif de marquage avec une fonction diazométhyle comme le *méta*-bioPMDAM (conditions (b)).

Pour atteindre le niveau d'intensité obtenue avec le dérivé *méta*-bioPMDAM, une étape d'amplification du signal est nécessaire (conditions a2). Ceci montre bien l'efficacité de la  
5 fonction réactive diazométhyle par rapport à l'incorporation traditionnelle de base modifiée comme le d-UTP fluorescéine (protocole de référence (b)).

**Exemple 26 : Fragmentation de l'ADN double brin par sonication :**

10

Des amplicons ADN ont été obtenus en utilisant le protocole décrit dans l'exemple 5.1. Ces amplicons ont été fragmentés par sonication en présence et en absence du marqueur.

**a. Marquage des amplicons PCR pendant la sonication :**

15 A 10 µL de réaction PCR sont ajoutés 2 µL de *méta*-BioPMDAM (100 mM dans DMSO). Le volume est ajusté à 100 µL par de l'eau pure le pH est ajusté à 6,5. Le mélange est incubé 30 min à 60°C dans un bain d'une cuve à ultrasons (fréquence 35 kHz, modèle T460-H, Bioblock, France).

20 **b. Marquage pendant la fragmentation chimique des amplicons PCR (protocole de référence en une étape) :**

A 10 µL de réaction PCR sont ajoutés 50 µL de formiate de sodium pH 3 (50 mM) et 2 µL de *méta*-BioPMDAM (100 mM dans du DMSO). Le volume est ajusté à 100 µL. La solution est incubée 30 min à 60°C.

25

Les essais sont réalisés en duplicata afin de pouvoir analyser la fragmentation de l'ADN sur gel et l'efficacité de marquage par hybridation et lecture de la puce à ADN comme décrit précédemment (exemple 17 sur la détection de la phycoérythrine).

Analyse sur gel

L'analyse a été effectuée sur gel dénaturant de polyacrylamide (8 % polyacrylamide, 7 M urée, 1 X TBE) utilisant coloration au bromure d'éthidium.

L'analyse sur gel montre que les amplicons ADN sont fragmentés par sonication à 60°C.

5

Résultats

Conditions	Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
<i>a. Marquage pendant la fragmentation par sonication</i>	93,8	2271	631	3,6
<i>b. Marquage pendant la fragmentation chimique (conditions de référence)</i>	>95	19639	1459	13,5

Tableau 22 : Fragmentation de l'ADN double brin par sonication

10

Les résultats de marquage du tableau 10 pendant la sonication (conditions *a*) sont satisfaisants. Ceci montre que la fragmentation physique par sonication des cibles ADN est compatible avec la chimie de marquage par des réactifs de marquage portant une fonction diazométhyle.

15 Les faibles résultats de marquage dans ce cas sont certainement dus au fait que le marqueur se dégrade sous l'effet des ultrasons. Les résultats avec la fragmentation par création de site abasique par action du pH acide sont meilleurs.

20 Exemple 27 : Marquage, fragmentation et dénaturation de l'ADN en une étape :

Les amplicons ADN ont été préparés par amplification PCR selon le protocole décrit dans l'exemple 5.1.

Deux réactions de marquage ont été réalisées :

25

*a. Marquage, fragmentation et dénaturation à 95°C en une seule étape :*

A 10 µL de PCR sont ajoutés 50 µL de tampon formiate de sodium pH3 (50 mM) et 2 µL du marqueur *méta*-BioPMDAM (100mM dans du DMSO anhydre). Le volume final est ajusté à 100 µL. La solution est ensuite incubée 30 min à 95°C. Dans ce cas, le mélange réactionnel a été hybridé sur puce à ADN sans aucune purification préalable.

*b. Marquage et fragmentation à 60°C:*

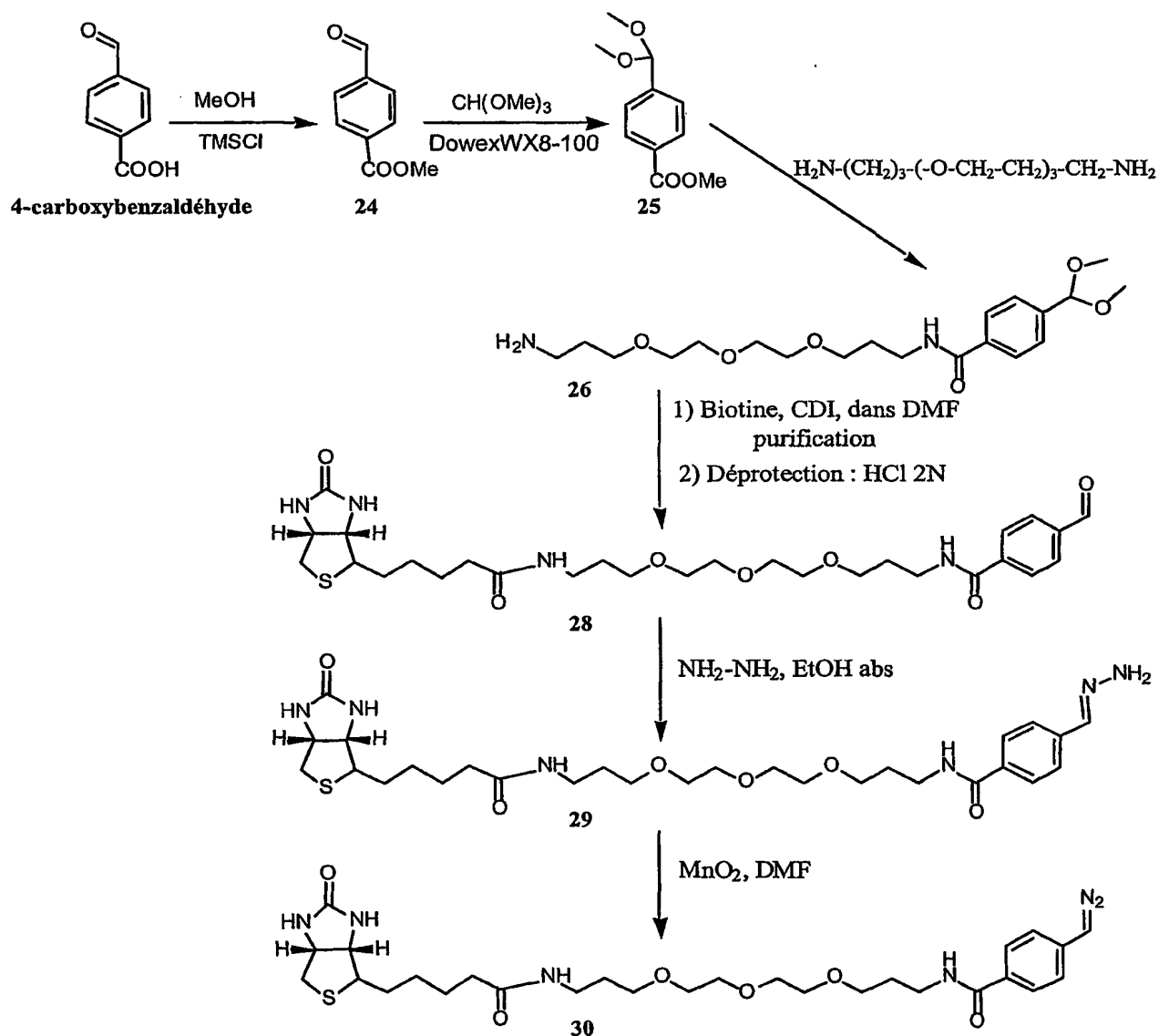
A 10 µL de PCR sont ajoutés 50 µL de tampon formiate de sodium pH3 (50 mM) et 2 µL du marqueur *méta*-Bio-DPDAM (3d) (100mM dans du DMSO anhydre). Le volume final est ajusté à 100 µL. La solution est ensuite incubée 30 min à 60°C. Le mélange réactionnel a été ensuite purifié selon le protocole décrit auparavant. Dans ce protocole et avant hybridation sur puce à ADN, les fragments ont été dénaturés selon le protocole décrit dans l'exemple 20.2.

Résultats

Protocole utilisé	Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
<i>a. Marquage, fragmentation et dénaturation à 95°C</i>	>95	5426	506	10,7
<i>b. Marquage et fragmentation à 60°C puis dénaturation à 95°C</i>	>95	7015	818	6,8

Tableau 23 : Marquage, fragmentation et dénaturation de l'ADN en une étape

L'exemple 20.2 a démontré l'importance de la dénaturation de l'ADN double brin pour la sensibilité de détection. Ces résultats du tableau 23 montrent qu'avec l'approche fragmentation par création de site abasique, le marquage, la fragmentation et la dénaturation de l'ADN peuvent être réalisées en une seule étape, ce qui représente une amélioration notable du point de vue de la simplicité et du temps pour l'utilisateur et cela sans affecter la sensibilité de détection.

**Exemple 28 : Synthèse du *para*-Bio-EG3-PDAM :**

5

**● Protection du 4-carboxylbenzaldéhyde :**

- 10 Le 4-carboxybenzaldéhyde est commercial. On le dissout (3 g ; 20 mmol) dans une solution de chlorure de triméthylsilyle (10 g ; 92 mmol) dans 100 mL de MeOH. Le mélange est laissé



sous agitation pendant 40 h à température ambiante. Après évaporation, un solide blanc correspondant au 4-méthoxycarbonylbenzaldéhyde **24** est isolé, caractérisé par RMN et utilisé tel quel pour la réaction suivante.

- 5 RMN  $^1\text{H}$  (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 10,07 (s, 1H,  $-\text{CHO}$ ) ; 8,17 (d, 2H,  $J = 8$  Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$ ) ; 7,92 (d, 2H,  $J = 8$  Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$ ) ; 3,93 (s, 3H,  $\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_3$ ).

● Protection du 4'-méthoxycarbonylbenzaldéhyde :

- 10 Le 4-méthoxycarbonylbenzaldéhyde (3,35 g ; 20 mmol) est mis en solution avec de l'orthoformiate de triméthyle (4,8 g ; 40 mmol) en présence de Dowex 50WX8-100 (1 g). Le mélange est chauffé à reflux pendant 2 h, puis filtré et évaporé. Après un essai de recristallisation, une analyse par RMN montre que la réaction n'est pas complète et celle-ci est relancée dans 30 mL de MeOH, 30 mL de  $\text{CH}(\text{OMe})_3$  et 1 g de Dowex 50WX8-100 à  
15 température ambiante. On réalise une filtration puis une évaporation, afin d'obtenir 3,55 g (16,89 mmol, 84 %) de produit **25**.

RMN  $^1\text{H}$  (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 8,01 (d, 2H,  $J = 8$  Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$ ) ; 7,50 (d, 2H,  $J = 8$  Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$ ) ; 5,41 (s, 1H, CH) ; 3,93 (s, 3H,  $-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_3$ ) ; 3,29 (s, 6H,  $-\text{O}-\text{CH}_3$ ).

20

● Composé **26** :

- On solubilise le composé **25** (3,1 g ; 14,8 mmol) dans 16 mL (73 mmol) de 4,7,10-Trioxa-1,13-tridécanediamine. La solution obtenue est chauffée à 140-150°C pendant 2 h. Le mélange  
25 est ensuite dissous dans 100 mL de DCM (dichlorométhane ou  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) et lavé 6 fois avec 10 mL d'eau. La phase organique est séchée avec  $\text{Mg SO}_4$  puis évaporée jusqu'à l'obtention d'une huile. Cette huile est lavée avec du pentane 3 fois de suite par décantation, puis une nouvelle extraction avec DCM et  $\text{H}_2\text{O}$  est réalisée. Après séchage sur  $\text{MgSO}_4$  et évaporation, le produit **26** est isolé avec un rendement de 63 % (9,27 mmol).

30

RMN  $^1\text{H}$  (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7,78 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$ ) ; 7,46 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$ ) ; 5,39 (s, 1H, CH) ; 3,62-3,47 (m, 14H,  $\text{H}_{7',8',10',11'}$  et  $\text{H}_{5',13'}$  et  $\text{H}_{3'}$ ) ; 3,29 (s, 6H, -O- $\text{CH}_3$ ) ; 2,72 (m, 2H,  $\text{H}_{15'}$ ) 1,87 (m, 2H,  $\text{H}_4$ ) ; 1,64 (m, 2H,  $\text{H}_{14'}$ ) ; 1,30 (s large, 2H,  $\text{NH}_2$ ).

5     ● Composé biotinylé 27 :

La biotine (500 mg ; 2,05 mmol) est mise en suspension dans 10 mL de DMF puis 365 mg (2,25 mmol) de CDI sont ajoutés. Cette solution est laissée sous agitation pendant 30 min à température ambiante. Le composé 26 (900 mg ; 2,26 mmol) est dissous dans 1 mL de DMF, puis ajouté petit à petit à la solution précédente. Le mélange ainsi obtenu est laissé sous agitation pendant 1 h à température ambiante. Après évaporation, une purification sur colonne par chromatographie-flash (colonne de 20 mm de diamètre) est réalisée avec 250 mL de MeOH-DCM 6 %, puis avec 200 mL de MeOH-DCM 7 % et enfin 200 mL de MeOH-DCM 8 %. Les fractions correspondant au produit 27 sont rassemblées puis évaporées à sec pour donner 1,00 g d'huile avec un rendement estimé à 50 %.

RMN  $^1\text{H}$  (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 9,50 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{imidazole}}$ ) ; 7,80 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$ ) ; 7,64 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{imidazole}}$ ) ; 7,46 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$  et 1H,  $\text{NH}_2$ ) ; 7,05 (s, 2H,  $\text{H}_{\text{imidazole}}$ ) ; 6,76 (t, 1H,  $\text{NH}_{16'}$ ) , 6,20 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{B1}}$ ) ; 5,44 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{B3}}$ ) ; 5,37 (s, 1H, CH) ; 4,42 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B6a}}$ ) ; 4,24 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B3a}}$ ) ; 3,59-3,44 (m, 14H,  $\text{H}_{7',8',10',11'}$  et  $\text{H}_{5',13'}$  et  $\text{H}_{3'}$ ) ; 3,29 (m, 8H,  $\text{H}_{15'}$  et 2-O- $\text{CH}_3$ ) ; 3,07 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B4}}$ ) ; 2,84 et 2,66 (système ABX, 2H,  $^2J_{\text{AB}} = 5$  Hz,  $^3J_{\text{AX}} = 12$  Hz,  $^3J_{\text{BX}} = 0$  Hz,  $\text{H}_{\text{B6}}$ ) ; 2,13 (t, 2H,  $J$  = 8 Hz,  $\text{H}_{\text{B10}}$ ) ; 1,85 (m, 2H,  $\text{H}_4$ ) ; 1,66 (m, 2H,  $\text{H}_{14'}$ ) ; 1,40-1,37 (m, 6H,  $\text{H}_{\text{B7, B8, B9}}$ ).

25     ● Composé aldéhydique 28 :

L'acétal 27 est dissous dans 50 mL de chloroforme, puis 20 mL de HCl 2N sont ajoutés . Le mélange diphasique est vigoureusement agité pendant 15 min. On récupère la phase organique qu'on sèche sur  $\text{NaHCO}_3$  anhydre. On filtre, on évapore et le composé 28 est obtenu sous forme d'une pâte (495 mg ; 0,855 mmol) avec un rendement global de 42 % à partir de la biotine.

RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 10,05 (s, 1H, CHO) ; 7,98 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$ ) ; 7,92 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$ ) ; 7,58 (t, 1H,  $\text{NH}_{2'}$ ) ; 6,46 (t, 1H,  $\text{NH}_{16'}$ ) , 6,02 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{B1}}$ ) ; 5,19 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{B3}}$ ) ; 4,46 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B6a}}$ ) ; 4,27 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B3a}}$ ) ; 3,66-3,56 (m, 10H,  $\text{H}_{7'}$ , 8',10',11' et  $\text{H}_5'$ ) ; 3,50-3,29 (m, 4H,  $\text{H}_{3',13'}$ ) ; 3,28 (m, 2H,  $\text{H}_{15'}$ ) ; 2,95 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B4}}$ ) ; 2,84 et 2,71 (système ABX, 2H,  $^2J_{\text{AB}}$  = 5 Hz,  $^3J_{\text{AX}}$  = 12 Hz,  $^3J_{\text{BX}}$  = 0 Hz,  $\text{H}_{\text{B6}}$ ) ; 2,15 (t, 2H,  $J$  = 8 Hz,  $\text{H}_{\text{B10}}$ ) ; 1,89 (m, 2H,  $\text{H}_4'$ ) ; 1,72-1,63 (m, 6H,  $\text{H}_{14'}$ ,  $\text{H}_{\text{B7}}$ ,  $\text{B9}$ ) ; 1,23 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{B8}}$ ).

● Composé hydrazone 29 :

10

L'aldéhyde 28 (495 mg ; 0,855 mmol) est dissous dans 10 mL d'éthanol absolu. L'hydrazine (350  $\mu\text{L}$  ; 7,20 mmol) est ajoutée, puis le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 1 h. L'huile obtenue après évaporation est dissoute dans EtOH abs, pour être de nouveau évaporée. On obtient alors une mousse qu'on triture au pentane. La pâte correspondant au produit 29

15 (511 mg ; 0,862 mmol) est obtenue avec un rendement de 100 %.

20

RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7,76 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$ ) ; 7,72 (s, 1H, CH) ; 7,56 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$ ) ; 7,34 (t, 1H,  $\text{NH}_{2'}$ ) ; 6,45 (t, 1H,  $\text{NH}_{16'}$ ) , 5,98 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{B1}}$ ) ; 5,78 (s large, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ; 5,18 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{B3}}$ ) ; 4,44 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B6a}}$ ) ; 4,26 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B3a}}$ ) ; 3,62-3,56 (m, 10H,  $\text{H}_{7'}$ , 8',10',11' et  $\text{H}_5'$ ) ; 3,48-3,45 (m, 4H,  $\text{H}_{3',13'}$ ) ; 3,27 (m, 2H,  $\text{H}_{15'}$ ) ; 3,07 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B4}}$ ) ; 2,84 et 2,68 (système ABX, 2H,  $^2J_{\text{AB}}$  = 5 Hz,  $^3J_{\text{AX}}$  = 12 Hz,  $^3J_{\text{BX}}$  = 0 Hz,  $\text{H}_{\text{B6}}$ ) ; 2,11 (t, 2H,  $J$  = 8 Hz,  $\text{H}_{\text{B10}}$ ) ; 1,86 (m, 2H,  $\text{H}_4'$ ) ; 1,72-1,59 (m, 6H,  $\text{H}_{14'}$ ,  $\text{H}_{\text{B7}}$ ,  $\text{B9}$ ) ; 1,21 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{B8}}$ ).

25

● Composé diazo 30 :

30

On solubilise l'hydrazone 29 (357 mg ; 0,602 mmol) dans 17,5 mL de DMF. On ajoute alors  $\text{MnO}_2$  (700 mg ; 7,7 mmol). Après 12 min d'agitation à température ambiante, le mélange est filtré sur millipore contenant de la célite (épaisseur : 2 cm) et du tamis moléculaire en poudre 3 Å (0,5 cm). Le mélange réactionnel est évaporé à sec. L'huile résiduelle obtenue est lavée à

l'éther, trois fois de suite. Le composé **30** (290 mg, 0,491 mmol) est obtenu sous forme d'un solide légèrement rose avec un rendement de 82 %.

RMN  $^1\text{H}$  (300MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8,28 (t, 1H,  $\text{NH}_2$ ) ; 7,77 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$ ) ; 7,74 (t, 1H,  $\text{NH}_{16}$ ) ; 7,00 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$ ) ; 6,38 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{B1}}$ ) ; 6,32 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{B3}}$ ) ; 5,80 (s, 1H,  $\text{CH-N}_2$ ) ; 4,27 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B6a}}$ ) ; 4,11 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B3a}}$ ) ; 3,51-3,44 (m, 10H,  $\text{H}_{7',8',10',11'}$  et  $\text{H}_5$ ) ; 3,37 (m, 2H,  $\text{H}_{15}$ ) ; 3,32 (m, 4H,  $\text{H}_{3',13'}$ ) ; 3,05 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B4}}$ ) ; 2,79 et 2,58 (système ABX, 2H,  $^2J_{\text{AB}}$  = 5 Hz,  $^3J_{\text{AX}}$  = 12 Hz,  $^3J_{\text{BX}}$  = 0 Hz,  $\text{H}_{\text{B6}}$ ) ; 2,02 (t, 2H,  $J$  = 8 Hz,  $\text{H}_{\text{B10}}$ ) ; 1,69 (m, 2H,  $\text{H}_4$ ) ; 1,59-1,48 (m, 6H,  $\text{H}_{14'}$ ,  $\text{H}_{\text{B7}}$ ,  $\text{B9}$ ) ; 1,25 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{B8}}$ ).

La réactivité du composé **30** a été testée sur 3'-Uridine-monophosphate et suivie par électrophorèse capillaire. Les conditions d'analyse sont celles de l'exemple 6.1. Les résultats montrent un temps de demi réaction de 45 minutes.

Le réactif est stable à -20°C pendant au moins 1 mois.

**Exemple 29 : Marquage et fragmentation des amplicons d'ADN avec le réactif de marquage para-Bio-EG3-PDAM :**

Les intérêts principaux de ce genre de molécules, c'est-à-dire de dérivés de PDAM portant un bras de liaison à base de polyéthylène glycol, sont de permettre l'éloignement de la fonction diazo par rapport à la biotine, et d'augmenter la solubilité et, au final, la réactivité de ces molécules.

Le dérivé para-Bio-EG3-PDAM **30** a été obtenu selon le schéma réactionnel décrit dans l'exemple 28. Les amplicons ADN ont été préparés par amplification PCR selon le protocole décrit dans l'exemple 5.1. Deux réactions de marquage ont été réalisées.

a. Marquage par le réactif *para*-Bio-EG3-PDAM :

A 10  $\mu$ L de PCR sont ajoutés 10  $\mu$ L de *para*-Bio-EG3-PDAM (100 mM dans du DMSO) et 77  $\mu$ L d'eau Dnase/Rnase free. La solution est homogène et ne présente pas de précipités.  
 5 Cette solution est incubée 10 min à 95°C, puis 3  $\mu$ L d'HCl à 0,1 M sont ajoutés et la solution est incubée 10 min à 95°C.

Le reste du protocole est identique à celui de l'exemple 8.

b. Marquage par le réactif *méta*-BioPMDAM :

10

A 10  $\mu$ L de PCR sont ajoutés 10  $\mu$ L de *méta*-BioPMDAM (100 mM dans du DMSO) et 77  $\mu$ L d'eau Dnase/Rnase free. La synthèse de ce produit est évoqué dans l'exemple 1.1. La solution présente un léger précipité. Cette solution est incubée 10 min à 95°C. Puis 3  $\mu$ L d'HCl 0,1 M sont ajoutés et la solution est incubée 10 min à 95°C.

15 Le reste du protocole est identique à celui de l'exemple 8.

Résultats :

Protocole utilisé	Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
a. Marquage par le réactif <i>para</i> -Bio-EG3-PDAM	> 95%	15151	621	24,4
b. Marquage par le réactif <i>méta</i> -BioPMDAM	> 95%	11226	515	21,8

20 Tableau 24 : Etude comparative du marquage et de la fragmentation d'amplicons d'ADN avec le *para*-Bio-EG3-PDAM et le *méta*-BioPMDAM

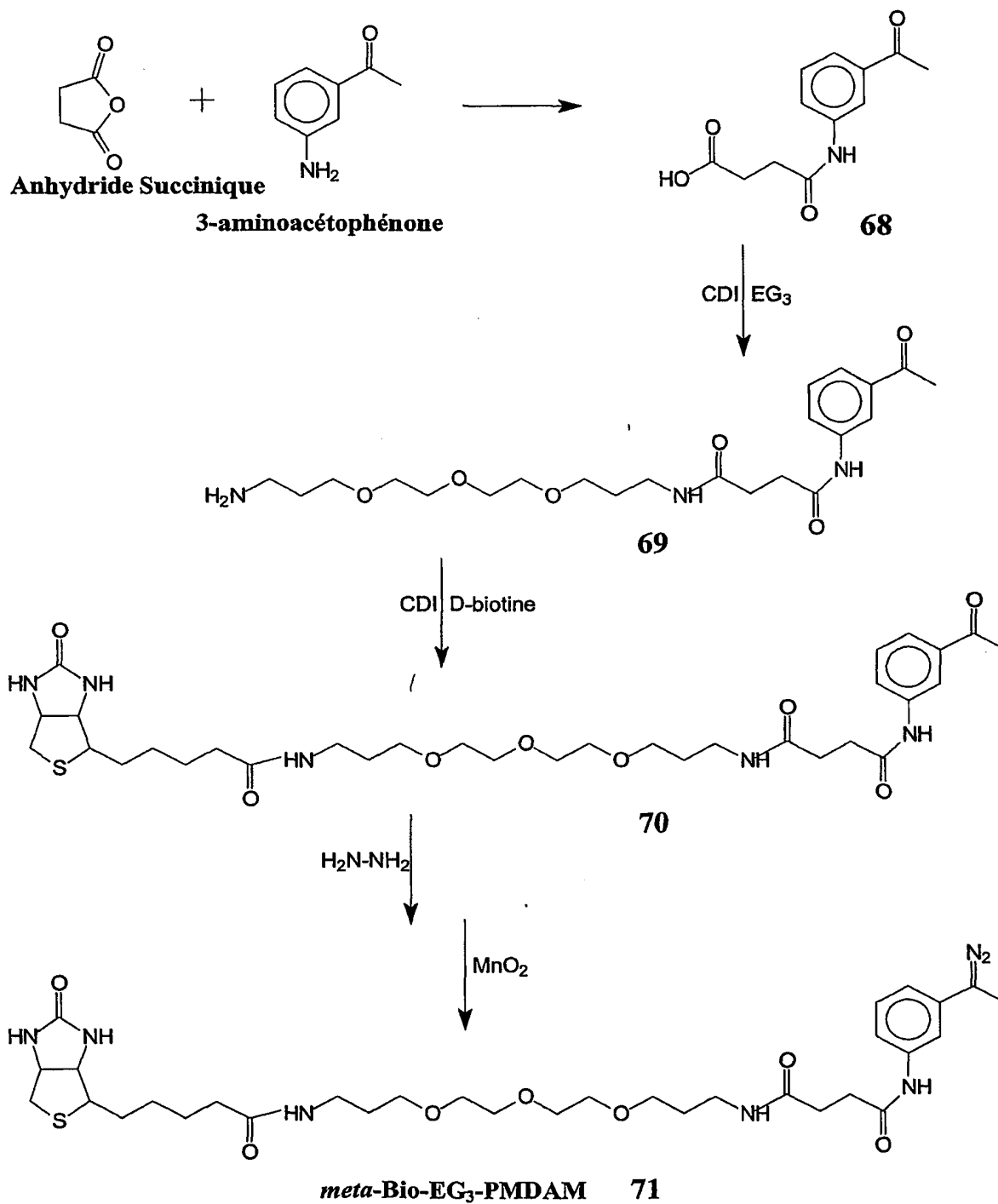
Les intensités de signal obtenues dans ce tableau 24 sont très satisfaisantes et le pourcentage d'homologie est élevé. Ce résultat montre que l'introduction d'un bras polyéthylène glycol sur  
 25 la molécule de marquage diazo permet d'augmenter la solubilité en phase aqueuse du réactif.

Le test est donc homogène. De plus, l'augmentation de la solubilité permet d'augmenter la réactivité du marqueur.

5 **Exemple 30 : Synthèse d'autres dérivés PDAM comportant un bras de liaison à base de polyéthylène glycol :**

**Exemple 30.1 : Synthèse du *méta*-Bio-EG3-PMDAM :**

10 **Schéma de synthèse**



Composé 68 :

On solubilise la 3-aminoacetophenone (14,5 g, 107 mmol) dans 50 ml de DMF anhydre. On ajoute l'anhydride succinique (10,7 g, 107 mmol) et on laisse sous agitation, sous argon et a température ambiante. Après 6 h, la solution est concentrée sous vide et 50 ml de méthanol sont ajoutés. Le précipité obtenu est filtré et lavé avec méthanol et éther. On obtient ainsi 19,4 g (81%) de produit **68** sous forme d'une poudre de couleur blanc cassé.

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 2,5-2,6 (m, 7H); 7,45 (t, 1H); 7,64 (d, 1H); 7,83 (d, 1H); 8,19 (s, 1H); 10,16 (s, 1H); 12,12 (s, 1H).

#### 10 Composé 69 :

On solubilise 5,07 g (22 mmol) du composé **68** dans 10 ml de DMF anhydre, sous argon. On met sur glace et on ajoute 5,00 g (32 mmol) de carbonyldiimidazole. Après 20 min, on ajoute lentement 20 ml (94,6 mmol) du 4, 7, 10-trioxatridecanediamine (EG<sub>3</sub>). Après 3h de réaction à température ambiante, on évapore le DMF et reprend le résidu dans 100 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. On fait des extractions avec du NaHCO<sub>3</sub> saturé et H<sub>2</sub>O, après quoi la phase organique est séchée avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et le solvant évaporé. On obtient ainsi 4,34 g (46%) du produit **69**.

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1,59 (m, 2H); 1,87 (m, 2H); 2,16 (s, 3H); 2,40 (m, 2H); 2,55 (m, 2H); 3,08 (m, 2H); 3,45 (m, 16H); 7,30 (t, 1H); 7,42 (d, 1H); 7,70 (d, 1H); 7,83 (t, 1H); 7,97 (s, 1H); 10,00 (s, 1H).

#### Composé biotinylé 70 :

On solubilise la D-biotine (1,0 g, 4,1 mmol) dans 10 ml de DMF anhydre, sous argon. On refroidit sur glace et on ajoute le carbonyldiimidazole (CDI) (0,665 g, 4,1 mmol) dans 10 ml de DMF anhydre. Après 15 min, on ajoute le composé **69** (1,8 g, 4,1 mmol) dans 2 ml de DMF anhydre. On laisse réagir 3 h à 35°C, puis on évapore le DMF et on reprend dans 100ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. On fait des extractions avec du NaHCO<sub>3</sub> saturé et H<sub>2</sub>O, après quoi la phase organique est séchée avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et le solvant évaporé. La caractérisation par RMN du produit ainsi obtenu montre qu'on obtient un mélange du produit **70** et du EG<sub>3</sub> libre. Une autre étape de purification est effectuée avant de continuer la synthèse.



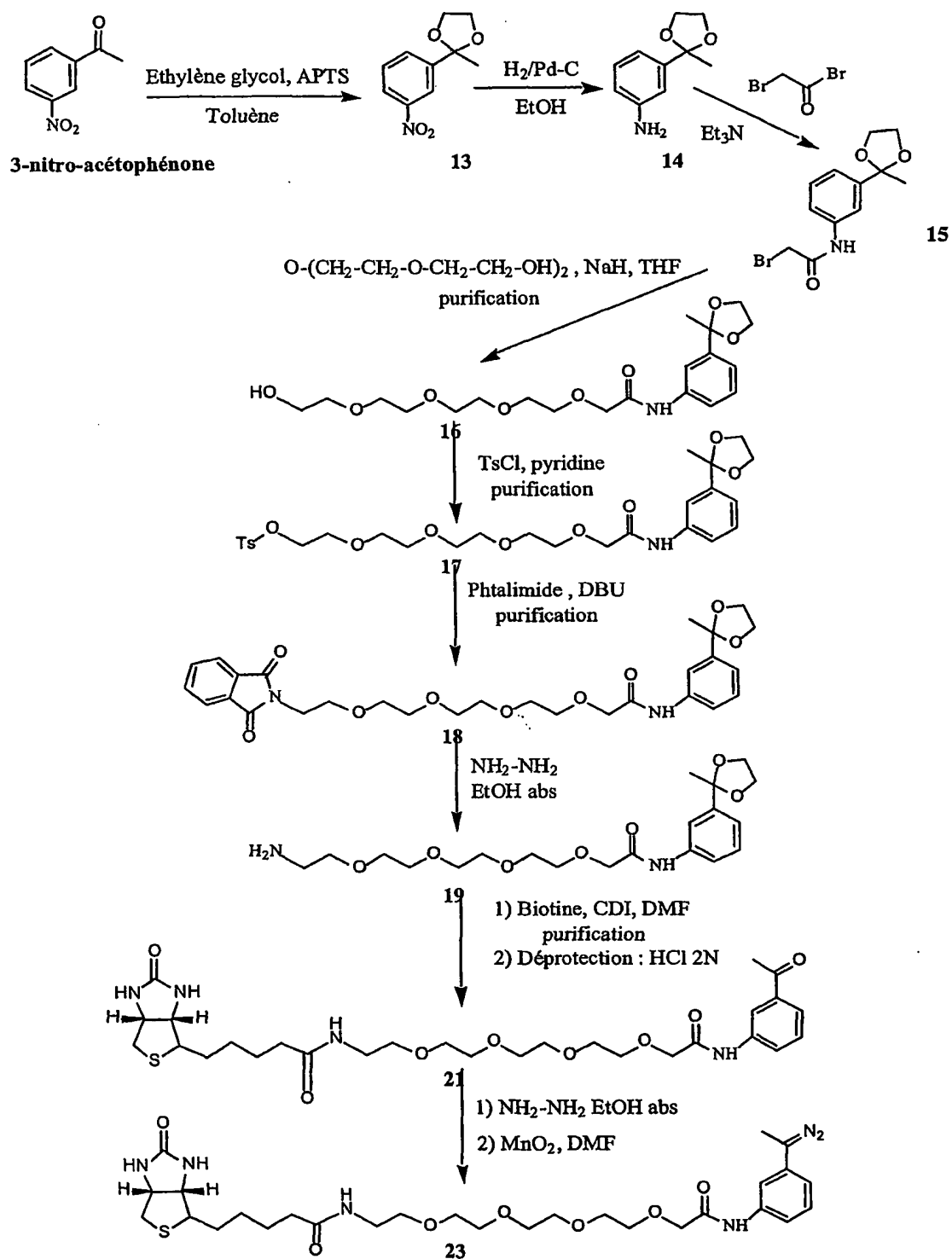
Le composé final, *méta*-Bio-EG<sub>3</sub>-PMDAM, est obtenu après deux étapes de synthèse selon le schéma décrit dans l'exemple 1.

5 L'intérêt de cette synthèse est double. D'une part, on obtient le produit **69** en seulement deux étapes; ce produit peut être utilisé comme précurseur du diazo avec la possibilité d'y accrocher des molécules détectables de nature différente, grâce au groupement amine terminal. Ce groupement permet aussi de greffer le composé **69** sur des supports solides, avec l'objectif d'immobiliser des acides nucléiques. D'une autre part, le composé **71** possède le même centre réactif que la *méta*-Bio-PMDAM (notre molécule de référence), ce qui facilite l'analyse des  
10 avantages liés à l'inclusion du bras éthylèneglycol (EG<sub>3</sub>).

Le réactif est stable à -20°C pendant au moins 1 mois.

**Exemple 30.2 : Synthèse du *méta*-Bio-EG<sub>4</sub>-PMDAM :**

15 Schéma de synthèse :



● Protection de la 3-nitro-acétophénone 13 :

On dissout 33 g (0,20 mol) de 3-nitro-acétophénone dans 400 mL de toluène, puis on ajoute 40 mL (0,717 mol) d'éthylène glycol et 600 mg (3,15 mmol) d'acide *para*-toluène sulfonique (APTS). On monte un système Dean Stark. On chauffe la solution pendant 3 h à 130°C. Après  
5 avoir laissé la solution revenir à température ambiante, on ajoute 400 mL d'acétate d'éthyle, puis on lave celle-ci avec 8 mL d'une solution de NaHCO<sub>3</sub> saturée. On sèche la phase organique sur MgSO<sub>4</sub>. Après évaporation, on obtient un solide jaune pâle 13 (39,72 g ; 0,190 mol) avec un rendement de 95 %.

10

RMN <sup>1</sup>H (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7,11 (t, 1H, *J* = 8 Hz, Ar-H) ; 6,87-6,78 (m, 2H, Ar-H) ; 6,59 (dd, 1H, *J* = 6,5 Hz, Ar-H) ; 4,00 (m, 2H, H<sub>2</sub>C<sub>acétale</sub>) ; 3,79 (m, 2H, H<sub>2</sub>C<sub>acétale</sub>) ; 1,61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

15 ● Préparation de l'amine 14 :

Le composé 13 (39,7 g ; 0,190 mol) est dissous dans 500 mL d'EtOH, puis 1 g de palladium sur charbon 10 % est ajouté. On chauffe pour tout dissoudre, puis on laisse la solution revenir à température ambiante. Après avoir fait le vide et mis la solution sous H<sub>2</sub>, on laisse sous forte  
20 agitation pendant 5 h. La solution est ensuite filtrée à chaud puis évaporée. Le produit 14 est lavé au pentane, et isolé sous forme d'un solide (34 g ; 0,189 mol) avec un rendement de 99 %.

25 RMN <sup>1</sup>H (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7,14 (t, 1H, *J* = 8 Hz, Ar-H) ; 6,85 (m, 2H, *J* = 7,5 Hz, Ar-H) ; 6,79 (s, 1H, Ar-H) ; 6,59 (dd, 1H, *J* = 6,5 Hz, Ar-H) ; 4,00 (m, 2H, H<sub>2</sub>C<sub>acétale</sub>) ; 3,77 (m, 2H, H<sub>2</sub>C<sub>acétale</sub>) ; 1,61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

● Composé bromé 15 :

30 L'amine 14 (12,3 g ; 68,7 mmol) et la triéthylamine (7 g ; 69 mmol) sont mises en solution dans 150 mL de DCM sous argon. On ajoute à -5 °C au goutte-à-goutte une solution de 13,8 g (60 mmol) de bromure de bromoacétyle dissous dans 150 mL de DCM. À la fin de l'addition,

on ajoute 100 mL de NaHCO<sub>3</sub> aqueux 1 N. On lave la phase organique deux fois de suite avec NaHCO<sub>3</sub> aqueux et on sèche sur MgSO<sub>4</sub>. Après évaporation à sec, 22,6 g d'huile marron est obtenue correspondant au composé 15 et utilisée telle quelle pour la réaction suivante.

- 5 RMN <sup>1</sup>H (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8,29 (s large, 1H, NH) ; 7,62 (dt, 1H<sub>4</sub>, J = 5 Hz, Ar-H) ; 7,47 (s, 1H, Ar-H<sub>2</sub>) ; 7,38-7,19 (m, 2H, Ar-H<sub>5,6</sub>) ; 4,00 (m, 2H, Br-CH<sub>2</sub>) ; 3,75 (m, 4H, H<sub>2</sub>C-H<sub>2</sub>C<sub>acétale</sub>) ; 1,61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

● Composé alcool 16 :

10

L'hydruide de sodium (3,3 g ; 82,5 mmol) est lavé trois fois avec du pentane puis mis en suspension dans 150 mL de THF, le tétra éthylène glycol (50 mL ; 0,29 mol) est alors ajouté à température ambiante. On laisse la réaction sous agitation pendant 15 min, puis on refroidit la solution à -5°C.

- 15 L'ajout du composé 15 préalablement dilué dans 25 mL de THF se fait au goutte-à-goutte. On laisse sous agitation pendant 30 min pour laisser revenir à température ambiante. On concentre la solution à 100 mL, puis on dilue celle-ci avec 500 mL de CHCl<sub>3</sub>. On lave trois fois de suite cette phase organique avec 250 mL de NaHCO<sub>3</sub> aqueux 1 N, puis on la sèche sur MgSO<sub>4</sub> avant de l'évaporer. On purifie le produit sur colonne de silice par chromatographie-
- 20 flash (colonne de 65 mm de diamètre) avec 1,5 L de MeOH-DCM 5 %, puis avec 500 mL de MeOH-DCM 7 %, et enfin 500 mL de MeOH-DCM 10 %. Les fractions correspondant au composé 16 sont rassemblées, puis évaporées à sec pour donner 17,4 g (42,1 mmol) de produit, avec un rendement de 61 %.

- 25 RMN <sup>1</sup>H (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8,86 (s large, 1H, NH) ; 7,71 (d, 1H, J = 7,5 Hz, Ar-H<sub>4</sub>) ; 7,51 (s, 1H, Ar-H<sub>2</sub>) ; 7,29-7,24 (m, 2H, Ar-H<sub>5,6</sub>) ; 4,09 (m, 2H, CO-CH<sub>2</sub>-O) ; 3,99 (m, 2H, H<sub>2</sub>C-H<sub>2</sub>C<sub>acétale</sub>) ; 3,72-3,53 (m, 20H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, H<sub>2</sub>C<sub>acétale</sub> et HO-CH<sub>2</sub>) ; 1,61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

● Composé tosylate 17 :

30

L'alcool 16 (4,13 g ; 10,0 mmol) est mis en solution dans 5 mL de pyridine. On ajoute ensuite 2,0 g (10,5 mmol) de chlorure de tosylate à température ambiante. On met sous agitation sous

argon pendant 10 h. On dilue avec 100 mL de DCM, on lave trois fois la phase organique avec 20 mL de NaHCO<sub>3</sub> aqueux 1 N, puis on la sèche sur MgSO<sub>4</sub> avant de la co-évaporer avec du toluène. Une purification sur colonne par chromatographie-flash (colonne de 50 mm de diamètre) est réalisée avec 500 mL de MeOH-DCM 2 %, puis 500 mL de MeOH-DCM 3 %, et enfin 500 mL de MeOH-DCM 4 %. Les fractions correspondant au produit 17 sont rassemblées puis évaporées à sec pour donner 3,68 g (6,48 mmol) d'huile avec un rendement estimé à 65 %.

RMN <sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8,86 (s large, 1H, NH) ; 7,76 (d, 4H, J = 5,5 Hz, Ar-H<sub>tosyl</sub>) ; 7,60 (d, 1H, J = 7,5 Hz, Ar-H<sub>4</sub>) ; 7,50 (s, 1H, Ar-H<sub>2</sub>) ; 7,32-7,22 (m, 2H, Ar-H<sub>5,6</sub>) ; 4,10 (m, 2H, CO-CH<sub>2</sub>-O) ; 4,00 (m, 2H, H<sub>2</sub>C<sub>acétale</sub>) ; 3,73-3,54 (m, 20H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, H<sub>2</sub>C<sub>acétale</sub> et HO-CH<sub>2</sub>) ; 2,42 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>) ; 1,61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

● Composé phthalimide 18 :

On met le tosylate 17 (3,68 g ; 6,48 mmol) en solution avec 1,52 g (10,0 mmol) de DBU (1,8-diazobicyclo-[5.4.0]-undécène) puis on ajoute le phthalimide (1,47 g ; 10 mmol). La solution ainsi obtenue est chauffée à 85-90°C pendant 17 h puis évaporée. On purifie le produit sur colonne de silice par chromatographie-flash (colonne de 50 mm de diamètre) avec 1 L d'acétone-DCM 15 %, puis avec 1 L d'acétone-DCM 20 %. Les fractions correspondant au composé 18 sont rassemblées, puis évaporées à sec pour donner 3,15 g (5,8 mmol) de produit, avec un rendement de 90 %.

RMN <sup>1</sup>H (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8,73 (s large, 1H, NH) ; 7,79 (m, 2H, Ar-H<sub>phta</sub>) ; 7,99 (m, 2H, Ar-H<sub>phta</sub> et Ar-H<sub>4</sub>) ; 7,49 (s, 1H, Ar-H<sub>2</sub>) ; 7,27-7,18 (m, 2H, Ar-H<sub>5,6</sub>) ; 4,10 (m, 2H, CO-CH<sub>2</sub>-O) ; 4,00 (m, 2H, H<sub>2</sub>C<sub>acétale</sub>) ; 3,69-3,56 (m, 20H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, H<sub>2</sub>C<sub>acétale</sub> et N<sub>phta</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 1,61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

● Composé amine 19 :

Le produit **18** est dissous dans 20 mL d'EtOH absolu en chauffant à reflux à 75-80°C. L'hydrazine (1,07 mL ; 22,1 mmol) est ensuite ajoutée, et la réaction est laissée sous agitation pendant 1 h 15. Le précipité obtenu est filtré sur fritté et la phase éthanolique évaporée. Le précipité blanc est ensuite lavé au DCM, et la phase DCM est évaporée. L'huile jaune obtenue (2,3 g ; 5,57 mmol) est directement utilisée pour la réaction suivante, même si elle contient de l'imidazole qui pourra être éliminé par la suite, lors de l'étape de déprotection de l'acétal.

10 RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 8,83 (s large, 1H, NH) ; 7,69 (d, 1H,  $J$  = 7,5 Hz, Ar- $\text{H}_4$ ) ; 7,51 (s, 1H, Ar- $\text{H}_2$ ) ; 7,30-7,19 (m, 2H, Ar- $\text{H}_{5,6}$ ) ; 4,10 (m, 2H, CO- $\text{CH}_2$ -O) ; 4,00 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}_{\text{acétale}}$ ) ; 3,69-3,56 (m, 20H, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -O,  $\text{H}_2\text{C}_{\text{acétale}}$  et  $\text{H}_2\text{N-CH}_2$ ) ; 1,61 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

● Composé biotinylé 20 :

15

On solubilise la D-Biotine (1,05 g ; 4,32 mmol) dans 10 mL de DMF anhydre. On ajoute sous argon 790 mg (4,87 mmol) de carbonyle diimidazole (CDI). Après 10 min d'agitation, on ajoute l'amine **19** diluée dans 5 mL de DMF. La solution est laissée 40 min sous agitation, puis évaporée avant d'être purifiée sur colonne par chromatographie-flash.

20 Pour ceci on utilise une colonne de 50 mm de diamètre avec comme éluant 500 mL de MeOH-DCM 5 %, puis 500 mL de MeOH-DCM 10 %, et enfin 500 mL de MeOH-DCM 15 %. Les fractions correspondant au produit **20** sont rassemblées puis évaporées à sec pour donner une huile jaune (1,66 g ; 2,6 mmol).

25 L'huile jaune obtenue (2,4 g) contenant d'après le spectre RMN environ 30 % en poids d'imidazole. On en déduit donc que le rendement de la réaction aboutissant au produit **20** est d'environ 60 % par rapport à la biotine de départ.

30 RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 8,80 (s large, 1H, NH) ; 7,66 (m, 3H, Ar- $\text{H}_4$  et  $\text{H}_{\text{imidazole}}$ ) ; 7,54 (s, 1H, Ar- $\text{H}_2$ ) ; 7,28-7,24 (m, 2H, Ar- $\text{H}_{5,6}$ ) ; 7,07 (s, 2H,  $\text{H}_{\text{imidazole}}$ ) ; 6,59 (t, 1H,  $\text{NH}_{15}$ ) ; 6,06 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{B1}}$ ) ; 5,19 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{B3}}$ ) ; 4,45 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B6a}}$ ) ; 4,27 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B3a}}$ ) ; 4,10 (s, 2H,  $\text{H}_3$ ) ; 4,00 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}_{\text{acétale}}$ ) ; 3,75-3,49 (m, 18H, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -O et  $\text{H}_2\text{C}_{\text{acétale}}$ ) ;

3,36 (m, 2H, H<sub>14'</sub>) ; 3,09 (m, 1H, H<sub>B4</sub>) ; 2,85 et 2,66 (système ABX, 2H,  $^2J_{AB} = 5$  Hz,  $^3J_{AX} = 12$  Hz,  $^3J_{BX} = 0$  Hz, H<sub>B6</sub>) ; 2,16 (t, 2H,  $J = 8$  Hz, H<sub>B10</sub>) ; 1,61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ; 1,59-1,3 (m, 6H, H<sub>B9</sub>, B8, B7).

5     ● Composé cétone 21 :

L'acétal 20 est dissous dans 80 mL de chloroforme, puis 30 mL de HCl 2 N sont ajoutés. On laisse sous forte agitation pendant 45 min. La phase organique est récupérée puis séchée sur NaHCO<sub>3</sub> anhydre. Après filtration, la solution est évaporée et l'huile obtenue est lavée au  
10     pentane pour donner le produit 21 (1,48 g ; 2,48 mmol) avec un rendement de 99 %.

RMN <sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8,99 (s large, 1H, NH) ; 8,07 (s, 1H, Ar-H<sub>2</sub>) ; 7,98 (d, 2H,  $J = 8$  Hz, Ar-H<sub>4</sub>) ; 7,66 (d, 2H,  $J = 8$  Hz, Ar-H<sub>6</sub>) ; 7,42 (t, 2H,  $J = 8$  Hz, Ar-H<sub>5</sub>) ; 6,38 (t, 1H, NH<sub>15'</sub>) ; 5,78 (s large, 1H, NH<sub>B1</sub>) ; 4,96 (s large, 1H, NH<sub>B3</sub>) ; 4,47 (m, 1H, H<sub>B6a</sub>) ; 4,29 (m,  
15     1H, H<sub>B3a</sub>) ; 4,13 (s, 2H, H<sub>3'</sub>) ; 3,76-3,37 (m, 16H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O) ; 3,32 (m, 2H, H<sub>14'</sub>) ; 3,11 (m, 1H, H<sub>B4</sub>) ; 2,89 et 2,75 (système ABX, 2H,  $^2J_{AB} = 5$  Hz,  $^3J_{AX} = 12$  Hz,  $^3J_{BX} = 0$  Hz, H<sub>B6</sub>) ; 2,59 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ; 2,16 (t, 2H,  $J = 8$  Hz, H<sub>B10</sub>) ; 1,64-1,40 (m, 6H, H<sub>B9</sub>, B8, B7).

● Composé hydrazone 22 :

20

La cétone 21 est dissoute dans 20 mL d'EtOH absolu. On chauffe à reflux à 75 –80°C. On ajoute ensuite l'hydrazine (816 µL ; 16,81 mmol) et on laisse sous agitation pendant 3 h. Après filtration, on évapore à sec, on redissout dans l'éthanol jusqu'à l'obtention d'une mousse blanche collante. Dans un deuxième temps, on dissout cette mousse dans 50 mL de  
25     chloroforme puis on ajoute 20 mL d'une solution de NaHCO<sub>3</sub> saturée. On lave bien puis on récupère la phase organique. On la sèche sur Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhydre et après filtration, on évapore à sec afin d'obtenir une nouvelle mousse collante. Celle-ci correspond au produit 22 (842 mg g ; 1,38 mmol) et est obtenue avec un rendement de 66 %.

30     RMN <sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8,81 (s large, 1H, NH) ; 8,82 (s, 1H, Ar-H<sub>2</sub>) ; 7,64 (d, 2H,  $J = 8$  Hz, Ar-H<sub>4</sub>) ; 7,32 (m, 4H, Ar-H<sub>5,6</sub>) ; 6,43 (t, 1H, NH<sub>15'</sub>) ; 5,89 (s large, 1H, NH<sub>B1</sub>) ; 5,46 (s

large, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 4,99 (s large, 1H, NH<sub>B3</sub>) ; 4,44 (m, 1H, H<sub>B6a</sub>) ; 4,27 (m, 1H, H<sub>B3a</sub>) ; 4,11 (s, 2H, H<sub>3'</sub>) ; 3,70-3,37 (m, 16H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O) ; 3,32 (m, 2H, H<sub>14'</sub>) ; 3,08 (m, 1H, H<sub>B4</sub>) ; 2,87 et 2,67 (système ABX, 2H, <sup>2</sup>J<sub>AB</sub> = 5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>AX</sub> = 12 Hz, <sup>3</sup>J<sub>BX</sub> = 0 Hz, H<sub>B6</sub>) ; 2,11 (m, 5H, CH<sub>3</sub> et H<sub>B10</sub>) ; 1,64-1,40 (m, 6H, H<sub>B9</sub>, B<sub>8</sub>, B<sub>7</sub>).

5

● Composé diazo 23 :

L'hydrazone **22** (100mg ; 0,164 mmol) est dissoute dans 1 mL de DMF sous argon. On ajoute 80 mg de MnO<sub>2</sub> activé et on laisse sous forte agitation pendant 30 min. Le mélange est filtré à travers une couche mixte Célite (3 cm) - tamis moléculaire en poudre (1 cm). La solution est ensuite évaporée à sec. L'huile obtenue en fin d'évaporation est triturée jusqu'à l'obtention d'un poudre rose correspondant au composé **23** (78 mg ; 0,128 mmol ; 78 %).

RMN <sup>1</sup>H (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 9,60 (s large, 1H, NH) ; 7,89 (s, 1H, Ar-H<sub>2</sub>) ; 7,76 (t, 1H, NH<sub>15'</sub>) ; 7,35-7,25 (m, 4H, Ar-H<sub>5,6</sub>) ; 6,64 (d, 2H, J = 8 Hz, Ar-H<sub>4</sub>) ; 6,36 (s large, 1H, NH<sub>B1</sub>) ; 6,32 (s large, 1H, NH<sub>B3</sub>) ; 4,28 (m, 1H, H<sub>B6a</sub>) ; 4,08 (m, 1H, H<sub>B3a</sub>) ; 4,06 (s, 2H, H<sub>3'</sub>) ; 3,55-3,31 (m, 16H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O) ; 3,17 (m, 2H, H<sub>14'</sub>) ; 3,08 (m, 1H, H<sub>B4</sub>) ; 2,80 et 2,59 (système ABX, 2H, <sup>2</sup>J<sub>AB</sub> = 5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>AX</sub> = 12 Hz, <sup>3</sup>J<sub>BX</sub> = 0 Hz, H<sub>B6</sub>) ; 2,13 (m, 5H, CH<sub>3</sub>) ; 2,13 (t, 2H, J = 8 Hz, H<sub>B10</sub>) ; 1,99-1,30 (m, 6H, H<sub>B9</sub>, B<sub>8</sub>, B<sub>7</sub>).

20

La réactivité du composé **23** a été testée sur 3'-Uridine-monophosphate et suivie par électrophorèse capillaire. Les conditions d'analyse sont celles de l'exemple 6.1. Les résultats montrent un temps de demi réaction de 30 minutes.

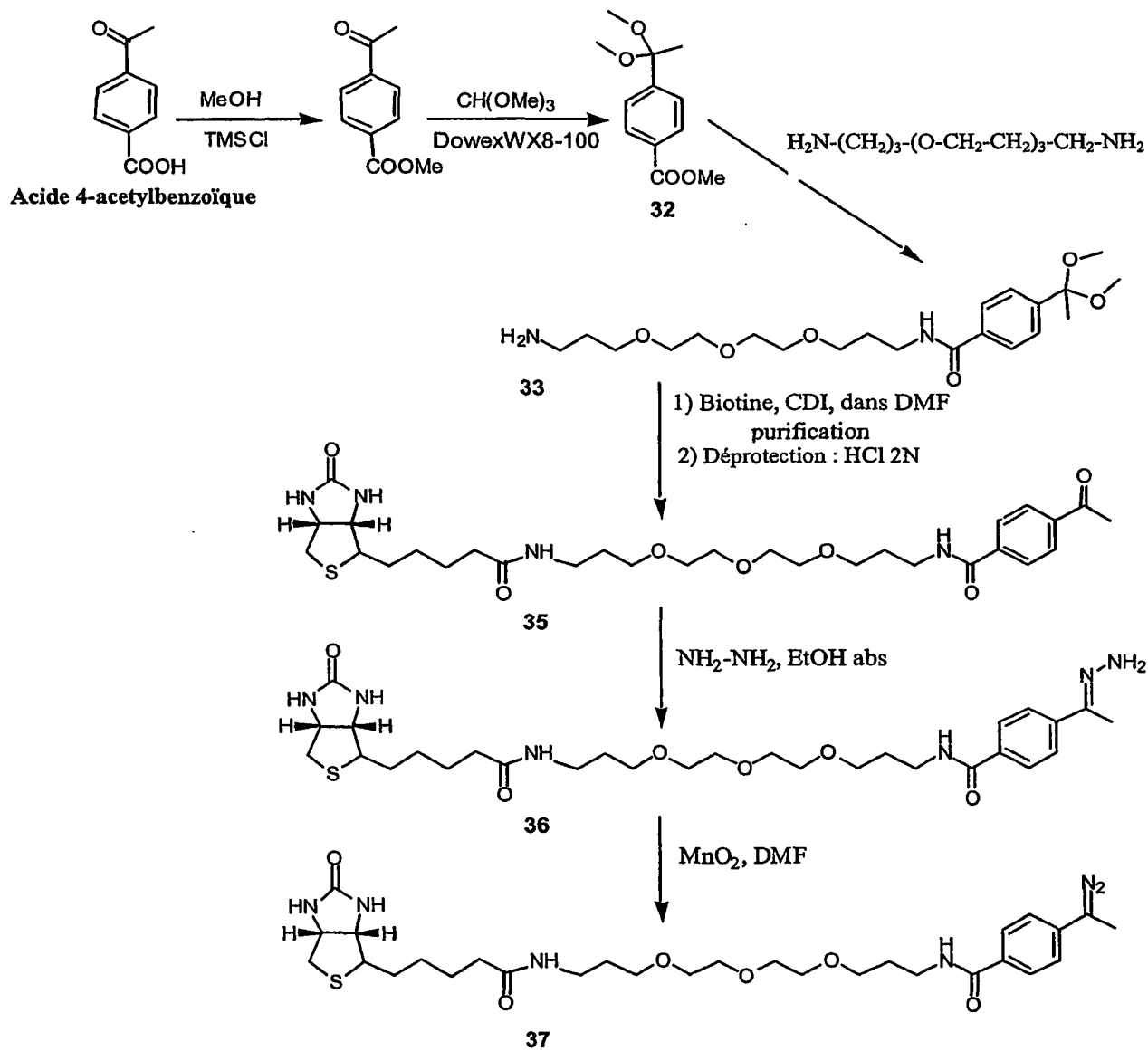
La stabilité du réactif est supérieure à 1 mois à -20°C.

25



**Exemple 30.3 : Synthèse du *para*-Bio-EG3-PMDAM :**

Schéma de synthèse :



● Protection de l'acide 4-acétylbenzoïque :

On dissout l'acide 4-acétylbenzoïque (1 g ; 6,1 mmol) dans une solution de chlorure de triméthylsilyle (TMSCl, 10 g ; 92 mmol) dans 5 mL de MeOH. Le mélange est chauffé à 90°C pendant une nuit. Après évaporation, un solide blanc correspondant au composé 31 (1,21 g ; 5,75 mmol) est isolé, caractérisé par RMN et utilisé tel quel pour la réaction suivante.

RMN  $^1\text{H}$  (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 8,08 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$ ) ; 7,59 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$ ) ; 3,18 (s, 6H, -O- $\text{CH}_3$ ) ; 1,53 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

10 ● Composé 32 :

On dissout le composé 31 (1,21 g ; 5,75 mmol) dans 5 ml d'orthoformiate de triméthyle en présence de Dowex 50WX8-100 (0,3 g). Le mélange est chauffé à 60°C pendant une nuit, puis filtré et évaporé pour donner le composé 32 (1,19 g ; 5,3 mmol) avec un rendement de 87 %.

15 RMN  $^1\text{H}$  (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 8,00 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$ ) ; 7,54 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$ ) ; 3,89 (s, 1H, CO-O-  $\text{CH}_3$ ) ; 3,16 (s, 6H, -O- $\text{CH}_3$ ) ; 1,51 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

● Composé 33 :

20 On solubilise le composé 32 (1,17 g ; 5,22 mmol) dans 5 mL (22,7 mmol) de 4,7,10-trioxa-1,13-tridécanediamine. La solution obtenue est chauffée à 140°C pendant 4 h. Le mélange est ensuite dissous dans 30 mL de DCM et lavé 3 fois avec 10 mL d'eau. La phase organique est séchée avec  $\text{Mg SO}_4$ , puis évaporée jusqu'à l'obtention d'une huile correspondant au produit 33 (1,44 g ; 3,49 mmol) avec un rendement de 67 %.

25

RMN  $^1\text{H}$  (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7,76 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$ ) ; 7,51 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$ ) ; 3,62-3,47 (m, 14H,  $\text{H}_{7',8',10',11'}$  et  $\text{H}_{5',13'}$  et  $\text{H}_{3'}$ ) ; 3,15 (s, 6H, -O- $\text{CH}_3$ ) ; 2,73 (m, 2H,  $\text{H}_{15'}$ ) 1,88 (m, 2H,  $\text{H}_{4'}$ ) ; 1,65 (m, 2H,  $\text{H}_{14'}$ ) ; 1,38 (s large, 2H,  $\text{NH}_2$ ).

● Composé biotinylé 34 :

La biotine (780 mg ; 3,19 mmol) est mise en suspension dans 13 mL de DMF. On ajoute ensuite 590 mg (3,60 mmol) de CDI. Cette solution est laissée sous agitation pendant 30 min à  
5 température ambiante. Le composé 33 est dissous dans 1 mL de DMF, puis ajouté petit à petit à la solution précédente. Le mélange ainsi obtenu est laissé sous agitation pendant 1 h à température ambiante. Après évaporation du DMF, une purification sur colonne par chromatographie-flash (colonne de 35 mm de diamètre) est réalisée avec 500 mL de MeOH-DCM 6 %, puis avec 250 mL de MeOH-DCM 8 %, et enfin 250 mL de MeOH-DCM 8 %.  
10 Les fractions correspondant au produit 34 sont rassemblées, puis évaporées à sec pour donner 1,05 g d'huile avec un rendement estimé à 30 %.

RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 8,49 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{imidazole}}$ ) ; 7,79 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$ ) ; 7,66 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{imidazole}}$ ) ; 7,50 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$ ) ; 7,38 (t, 1H,  $\text{NH}_2$ ) ; 7,11 (s, 2H,  $\text{H}_{\text{imidazole}}$ ) ; 6,67 (t, 1H,  $\text{NH}_{16'}$ ) ; 5,99 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{BI}}$ ) ; 5,15 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{B3}}$ ) ; 4,46 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B6a}}$ ) ; 4,27 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B3a}}$ ) ; 3,61-3,45 (m, 14H,  $\text{H}_{7',8',10',11'}$  et  $\text{H}_{5',13'}$  et  $\text{H}_3$ ) ; 3,28 (m, 2H,  $\text{H}_{15'}$ ) ; 3,15 (s, 6H,  $-\text{OCH}_3$ ) ; 2,85 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B4}}$ ) ; 2,85 et 2,69 (système ABX, 2H,  $^2J_{\text{AB}}$  = 5 Hz,  $^3J_{\text{AX}}$  = 12 Hz,  $^3J_{\text{BX}}$  = 0 Hz,  $\text{H}_{\text{B6}}$ ) ; 2,14 (t, 2H,  $J$  = 8 Hz,  $\text{H}_{\text{B10}}$ ) ; 1,86 (m, 2H,  $\text{H}_4$ ) ; 1,69 (m, 2H,  $\text{H}_{14'}$ ) ; 1,49 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ; 1,42-1,39 (m, 6H,  $\text{H}_{\text{B7, B8, B9}}$ ).

20

● Composé 35 :

L'acétal 34 est dissous dans 45 mL de chloroforme, puis 10 mL de HCl 2N sont ajoutés . Le mélange diphasique est vigoureusement agité pendant 5 min. On récupère la phase organique  
25 qu'on sèche sur  $\text{NaHCO}_3$  anhydre. On filtre, on évapore, et le composé 35 est obtenu sous forme d'un solide jaune clair (504 mg ; 0,87 mmol) avec un rendement global de 27 % à partir de la biotine.

RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7,97 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$ ) ; 7,91 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$ ) ; 7,51 (t, 1H,  $\text{NH}_2$ ) ; 6,50 (t, 1H,  $\text{NH}_{16'}$ ) ; 6,05 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{BI}}$ ) ; 5,23 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{B3}}$ ) ; 4,45 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B6a}}$ ) ; 4,27 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B3a}}$ ) ; 3,62-3,56 (m, 10H,  $\text{H}_{7',8',10',11'}$  et  $\text{H}_5$ ) ; 3,48-

30

3,46 (m, 4H,  $H_{3',13'}$ ) ; 3,27 (m, 2H,  $H_{15'}$ ) ; 3,10 (m, 1H,  $H_{B4}$ ) ; 2,85 et 2,71 (système ABX, 2H,  $^2J_{AB} = 5$  Hz,  $^3J_{AX} = 12$  Hz,  $^3J_{BX} = 0$  Hz,  $H_{B6}$ ) ; 2,60 (s, 3H,  $CH_3$ ) ; 2,14 (t, 2H,  $J = 8$  Hz,  $H_{B10}$ ) ; 1,89 (m, 2H,  $H_{4'}$ ) ; 1,72-1,61 (m, 6H,  $H_{14'}$ ,  $H_{B7}$ ,  $H_{B9}$ ) ; 1,40 (m, 2H,  $H_{B8}$ ).

5     ● Composé hydrazone 36 :

La cétone 35 (500 mg ; 0,864 mmol) est dissoute dans 11 mL de EtOH absolu. L'hydrazine (335  $\mu$ L ; 6,911 mmol) est ajoutée, puis le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 1 h. L'huile obtenue après évaporation, est dissoute dans EtOH abs, pour être de nouveau évaporée. On obtient alors une mousse collante correspondant au produit 36 (488 mg ; 0,823 mmol) avec un rendement de 95 %.

RMN  $^1H$  (300MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta = 7,76$  (d, 2H,  $J = 8$  Hz, Ar- $H_{2,6}$ ) ; 7,67 (d, 2H,  $J = 8$  Hz, Ar- $H_{3,5}$ ) ; 7,29 (t, 1H,  $NH_{2'}$ ) ; 6,46 (t, 1H,  $NH_{16'}$ ) ; 5,98 (s large, 1H,  $NH_{B1}$ ) ; 5,55 (s large, 2H,  $NH_2$ ) ; 5,14 (s large, 1H,  $NH_{B3}$ ) ; 4,45 (m, 1H,  $H_{B6a}$ ) ; 4,24 (m, 1H,  $H_{B3a}$ ) ; 3,62-3,51 (m, 10H,  $H_{7',8',10',11'}$  et  $H_{5'}$ ) ; 3,47-3,45 (m, 4H,  $H_{3',13'}$ ) ; 3,27 (m, 2H,  $H_{15'}$ ) ; 3,07 (m, 1H,  $H_{B4}$ ) ; 2,84 et 2,69 (système ABX, 2H,  $^2J_{AB} = 5$  Hz,  $^3J_{AX} = 12$  Hz,  $^3J_{BX} = 0$  Hz,  $H_{B6}$ ) ; 2,11 (t, 2H,  $J = 8$  Hz,  $H_{B10}$  et s, 3H,  $CH_3$ ) ; 1,86 (m, 2H,  $H_{4'}$ ) ; 1,72-1,59 (m, 6H,  $H_{14'}$ ,  $H_{B7}$ ,  $H_{B9}$ ) ; 1,21 (m, 2H,  $H_{B8}$ ).

20    ● Composé diazo 37 :

On solubilise l'hydrazone 36 (200 mg ; 0,337 mmol) dans 5 mL de DMF. On ajoute alors  $MnO_2$  (450 mg ; 5,17 mmol). Après 15 min d'agitation à température ordinaire, le mélange est filtré sur millipore contenant de la célite (épaisseur : 2 cm) et du tamis moléculaire en poudre 3 Å (0,5 cm). Le mélange réactionnel est évaporé à sec. L'huile résiduelle obtenue est lavée à l'éther trois fois de suite, jusqu'à l'obtention d'une poudre. Le composé 37 (290 mg, 0,491 mmol) est obtenu sous forme d'un solide rose avec un rendement de 93 %.

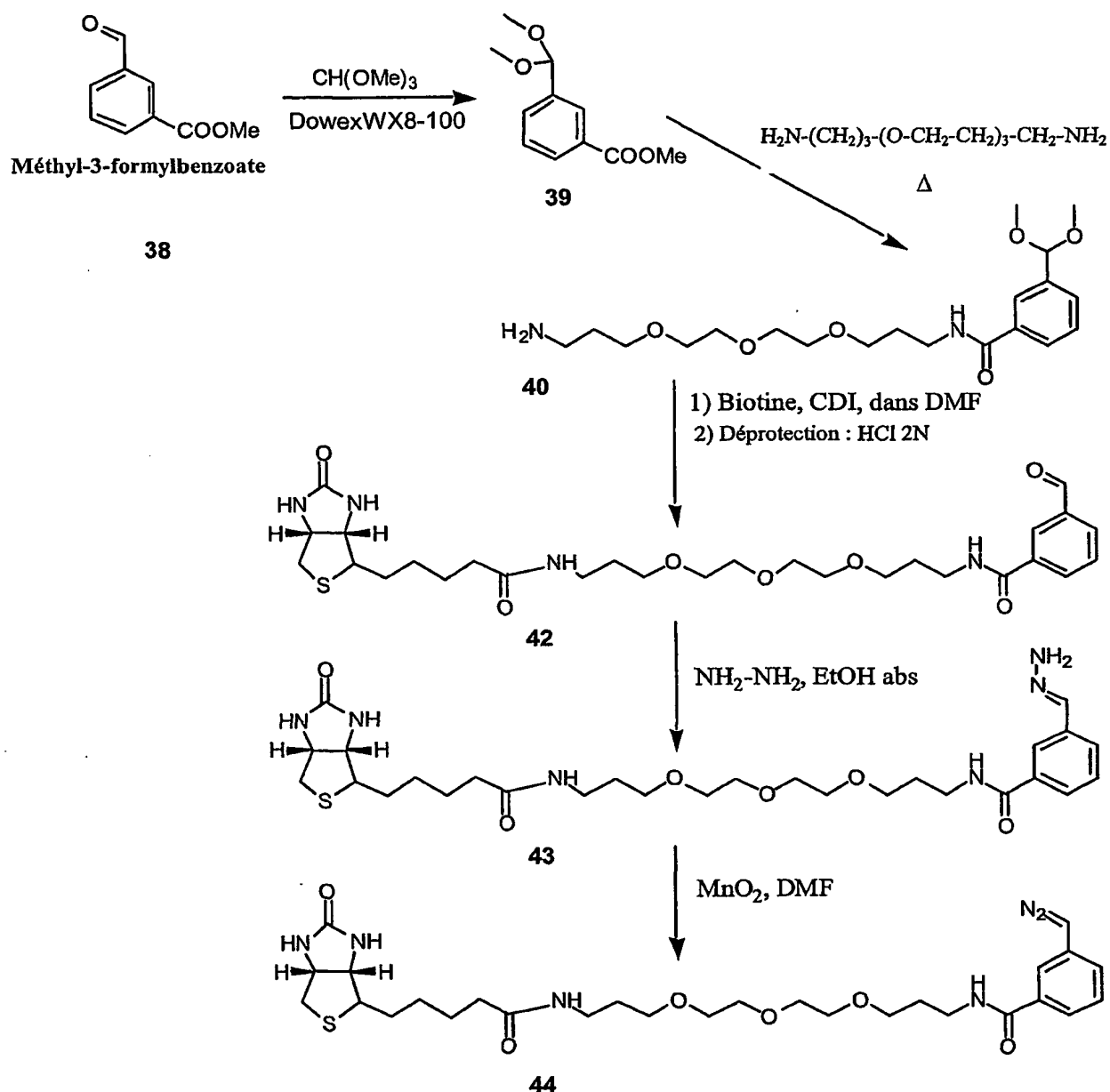
RMN  $^1H$  (300MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta = 8,33$  (t, 1H,  $NH_{2'}$ ) ; 7,83 (d, 2H,  $J = 8$  Hz, Ar- $H_{2,6}$ ) ; 7,73 (t, 1H,  $NH_{16'}$ ) ; 6,98 (d, 2H,  $J = 8$  Hz, Ar- $H_{3,5}$ ) ; 6,39 (s large, 1H,  $NH_{B1}$ ) ; 6,33 (s large, 1H,  $NH_{B3}$ ) ; 4,30 (m, 1H,  $H_{B6a}$ ) ; 4,12 (m, 1H,  $H_{B3a}$ ) ; 3,51-3,45 (m, 16H,  $H_{7',8',10',11'}$  et  $H_{5'}$  et  $H_{15'}$ ,

et  $H_{3',13'}$ ) ; 3,07 (m, 1H,  $H_{B4}$ ) ; 2,79 et 2,58 (système ABX, 2H,  $^2J_{AB} = 5$  Hz,  $^3J_{AX} = 12$  Hz,  $^3J_{BX} = 0$  Hz,  $H_{B6}$ ) ; 2,14 (s, 3H,  $CH_3$ ) ; 2,04 (t, 2H,  $J = 8$  Hz,  $H_{B10}$ ) ; 1,77 (m, 2H,  $H_{4'}$ ) ; 1,62-1,48 (m, 6H,  $H_{14'}$ ,  $H_{B7, B9}$ ) ; 1,31 (m, 2H,  $H_{B8}$ ).

- 5 La réactivité du composé 37 a été testée sur 3'-Uridine-monophosphate et suivie par électrophorèse capillaire. Les conditions d'analyse sont celles de l'exemple 6.1. Les résultats montrent un temps de demi réaction de 60 minutes.  
Le réactif est stable à -20°C pendant au moins 1 mois.

10 **Exemple 30.4 : Synthèse du *méta*-Bio-EG3-PDAM :**

Schéma de synthèse :



● Protection du méthyl-3-formylbenzoate 38 :

La résine Dowex 50WX8-100 (2 g) est mise en solution dans 25 mL de MeOH et 25 mL  
 5 d'orthoformate de triméthyle puis laissé sous agitation pendant 15 min. Après décantation, on  
 lave la résine deux fois de suite avec 20 mL de MeOH. On met ensuite cette résine dans 100  
 mL de MeOH, 50 mL de  $\text{CH}(\text{OMe})_3$  et on ajoute 7,12 g (43,4 mmol) de méthyl-3-

formylbenzoate. La solution est laissée 15 min sous agitation, puis filtrée sur papier plissé avant évaporation. Le produit **39** (9 g ; 43,1 mmol) est isolé sous forme d'un liquide jaune clair avec un rendement de 99 %.

- 5 RMN  $^1\text{H}$  (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 8,10 (s, H, Ar- $\text{H}_2$ ) ; 7,9 (d, H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_4$ ) ; 7,63 (d, H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_6$ ) ; 7,42 (t, H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_5$ ) ; 5,40 (s, 1H, CH) ; 3,90 (s, 3H, -CO-O- $\text{CH}_3$ ) ; 3,31 (s, 6H, -O- $\text{CH}_3$ ).

● Composé 40 :

10

On solubilise le composé **39** (2 g ; 9,5 mmol) dans 10,4 mL (47,6 mmol) de 4,7,10-Trioxa-1,13-tridécanediamine. La solution obtenue est chauffée à 165°C pendant 2 h. Le mélange est ensuite dissous dans 80 mL de DCM et lavé 4 fois avec 20 mL d'eau. Après séchage sur  $\text{MgSO}_4$  et évaporation, le produit **40** est isolé avec un rendement de 60 % (2,27 g ; 5,69 mmol).

15

RMN  $^1\text{H}$  (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7,84 (s, H, Ar- $\text{H}_2$ ) ; 7,75 (d, H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_4$ ) ; 7,53 (d, H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_6$ ) ; 7,39 (t, H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_5$ ) ; 5,38 (s, 1H, CH) ; 3,64-3,43 (m, 14H,  $\text{H}_{7',8',10',11'}$  et  $\text{H}_{5',13'}$  et  $\text{H}_{3'}$ ) ; 3,29 (s, 6H, -O- $\text{CH}_3$ ) ; 2,72 (m, 2H,  $\text{H}_{15'}$ ) 1,87 (m, 2H,  $\text{H}_{4'}$ ) ; 1,64 (m, 2H,  $\text{H}_{14'}$ ) ; 1,30 (s large, 2H,  $\text{NH}_2$ ).

20

● Composé biotinylé 41 :

La D-biotine (344 mg ; 1,40 mmol) est mise en suspension dans 4 mL de DMF puis 250 mg (1,54 mmol) de CDI sont ajoutés. Cette solution est laissée sous agitation pendant 30 min à température ambiante. Le composé **40** (616 mg ; 1,54 mmol) est dissous dans 2 mL de DMF, puis ajouté petit à petit à la solution précédente. Le mélange ainsi obtenu est laissé sous agitation pendant 50 min à température ambiante. Après évaporation, une purification sur colonne par chromatographie-flash (colonne de 30 mm de diamètre) est réalisée avec 750 mL de MeOH-DCM 10 %, puis avec 250 mL de MeOH-DCM 15 %. Les fractions correspondant

25

30

au produit **41** sont rassemblées puis évaporées à sec pour donner 740 mg d'huile avec un rendement estimé à 50 %.

RMN  $^1\text{H}$  (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7,87 (s, H, Ar- $\text{H}_2$ ) ; 7,78 (d, H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_4$ ) ; 7,65 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{imidazole}}$ ) ; 7,53 (d, H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_6$ ) ; 7,39 (t, H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_5$ ) ; 7,07 (s, 2H,  $\text{H}_{\text{imidazole}}$ ) ; 6,65 (t, 1H,  $\text{NH}_{16'}$ ) , 5,95 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{B1}}$ ) ; 5,38 (s, 1H, CH) ; 5,15 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{B3}}$ ) ; 4,43 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B6a}}$ ) ; 4,27 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B3a}}$ ) ; 3,59-3,44 (m, 14H,  $\text{H}_{7',8',10',11'}$  et  $\text{H}_{5',13'}$  et  $\text{H}_{3'}$ ) ; 3,29 (m, 8H,  $\text{H}_{15'}$  et 2-O- $\text{CH}_3$ ) ; 3,07 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B4}}$ ) ; 2,84 et 2,66 (système ABX, 2H,  $^2J_{\text{AB}}$  = 5 Hz,  $^3J_{\text{AX}}$  = 12 Hz,  $^3J_{\text{BX}}$  = 0 Hz,  $\text{H}_{\text{B6}}$ ) ; 2,13 (t, 2H,  $J$  = 8 Hz,  $\text{H}_{\text{B10}}$ ) ; 1,85 (m, 2H,  $\text{H}_{4'}$ ) ; 1,66 (m, 2H,  $\text{H}_{14'}$ ) ; 1,40-1,37 (m, 6H,  $\text{H}_{\text{B7}}$ ,  $\text{B8}$ ,  $\text{B9}$ ).

● Composé aldéhydique 42 :

L'acétal **41** est dissous dans 20 mL de chloroforme, puis 5 mL de HCl 2N sont ajoutés . Le mélange diphasique est vigoureusement agité pendant 15 min. On récupère la phase organique qu'on sèche sur  $\text{NaHCO}_3$  anhydre. On filtre, on évapore et le composé **42** est obtenu sous forme d'une huile jaune (593 mg ; 1,02 mmol) avec un rendement global de 87 % à partir de la biotine.

RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 10,04 (s, 1H, CHO) ; 8,34 (s, H, Ar- $\text{H}_2$ ) ; 8,16 (d, H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_4$ ) ; 7,96 (d, H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_6$ ) ; 7,72 (t, 1H,  $\text{NH}_{2'}$ ) ; 7,39 (t, H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_5$ ) ; 6,51 (t, 1H,  $\text{NH}_{16'}$ ) ; 6,00 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{B1}}$ ) ; 5,30 (s large, 1H,  $\text{NH}_{\text{B3}}$ ) ; 4,46 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B6a}}$ ) ; 4,27 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B3a}}$ ) ; 3,66-3,56 (m, 10H,  $\text{H}_{7',8',10',11'}$  et  $\text{H}_{5'}$ ) ; 3,50-3,29 (m, 4H,  $\text{H}_{3',13'}$ ) ; 3,28 (m, 2H,  $\text{H}_{15'}$ ) ; 2,95 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{B4}}$ ) ; 2,84 et 2,71 (système ABX, 2H,  $^2J_{\text{AB}}$  = 5 Hz,  $^3J_{\text{AX}}$  = 12 Hz,  $^3J_{\text{BX}}$  = 0 Hz,  $\text{H}_{\text{B6}}$ ) ; 2,15 (t, 2H,  $J$  = 8 Hz,  $\text{H}_{\text{B10}}$ ) ; 1,89 (m, 2H,  $\text{H}_{4'}$ ) ; 1,72-1,63 (m, 6H,  $\text{H}_{14'}$ ,  $\text{H}_{\text{B7}}$ ,  $\text{B9}$ ) ; 1,23 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{B8}}$ ).

● Composé hydrazone 43 :

L'aldéhyde **42** (593 mg ; 1,02 mmol) est dissous dans 10 mL d'éthanol absolu. L'hydrazine (400  $\mu\text{L}$  ; 8,19 mmol) est ajoutée, puis le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 50



min. L'huile jaune obtenue après évaporation, est triturée avec de l'éther jusqu'à l'obtention d'une poudre beige correspondant au produit 43 (404 mg ; 0,68 mmol) avec un rendement de 66 %. Une purification sur colonne par chromatographie-flash (colonne de 15 mm de diamètre) est réalisée ensuite sur un échantillon de 150 mg (0,253 mmol) avec 200 mL de MeOH-DCM 20% . Les fractions sont rassemblées puis évaporées à sec pour donner 144 mg de produit 43 avec un rendement de 76 %.

RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7,95 (s, H, Ar- $\text{H}_2$ ) ; 8,16 (d, H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_4$ ) ; 7,76 (s, 1H, CH) ; 7,96 (d, H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_6$ ) ; 7,38 (t, H,  $J$  = 8 Hz, Ar- $\text{H}_5$ ) ; 6,45 (t, 1H,  $\text{NH}_{16'}$ ) ; 5,98 (s large, 1H,  $\text{NH}_{B1}$ ) ; 5,72 (s large, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ; 5,18 (s large, 1H,  $\text{NH}_{B3}$ ) ; 4,44 (m, 1H,  $\text{H}_{B6a}$ ) ; 4,26 (m, 1H,  $\text{H}_{B3a}$ ) ; 3,62-3,56 (m, 10H,  $\text{H}_{7', 8', 10', 11'}$  et  $\text{H}_{5'}$ ) ; 3,48-3,45 (m, 4H,  $\text{H}_{3', 13'}$ ) ; 3,27 (m, 2H,  $\text{H}_{15'}$ ) ; 3,07 (m, 1H,  $\text{H}_{B4}$ ) ; 2,84 et 2,68 (système ABX, 2H,  $^2J_{AB}$  = 5 Hz,  $^3J_{AX}$  = 12 Hz,  $^3J_{BX}$  = 0 Hz,  $\text{H}_{B6}$ ) ; 2,11 (t, 2H,  $J$  = 8 Hz,  $\text{H}_{B10}$ ) ; 1,86 (m, 2H,  $\text{H}_{4'}$ ) ; 1,72-1,59 (m, 6H,  $\text{H}_{14', \text{H}_{B7, B9}}$ ) ; 1, 21 (m, 2H,  $\text{H}_{B8}$ ).

15

● Composé diazo 44 :

On solubilise l'hydrazone 43 (100 mg ; 0,187 mmol) dans 4 mL de DMF. On ajoute alors  $\text{MnO}_2$  (200 mg ; 2,3 mmol). Après 13 min d'agitation à température ordinaire, le mélange est filtré sur millipore contenant de la célite (épaisseur : 2 cm) et du tamis moléculaire en poudre 3 Å (0,5 cm). Le mélange réactionnel est évaporé à sec. L'huile résiduelle obtenue est lavée à l'éther, trois fois de suite. Le composé 44 (290 mg, 0,491 mmol) est obtenu sous forme d'un solide orange avec un rendement de 83 %.

RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  = 8,39 (t, 1H,  $\text{NH}_2$ ) ; 7,78 (t, 1H,  $\text{NH}_{16'}$ ) ; 7,39-7,34 (m, Ar-H) ; 7,09 (d, Ar-H) ; 6,38 (s large, 1H,  $\text{NH}_{B1}$ ) ; 6,32 (s large, 1H,  $\text{NH}_{B3}$ ) ; 5,78 (s, 1H,  $\text{CH-N}_2$ ) ; 4,27 (m, 1H,  $\text{H}_{B6a}$ ) ; 4,11 (m, 1H,  $\text{H}_{B3a}$ ) ; 3,51-3,44 (m, 10H,  $\text{H}_{7', 8', 10', 11'}$  et  $\text{H}_{5'}$ ) ; 3,37 (m, 2H,  $\text{H}_{15'}$ ) ; 3,32 (m, 4H,  $\text{H}_{3', 13'}$ ) ; 3,05 (m, 1H,  $\text{H}_{B4}$ ) ; 2,79 et 2,58 (système ABX, 2H,  $^2J_{AB}$  = 5 Hz,  $^3J_{AX}$  = 12 Hz,  $^3J_{BX}$  = 0 Hz,  $\text{H}_{B6}$ ) ; 2,02 (t, 2H,  $J$  = 8 Hz,  $\text{H}_{B10}$ ) ; 1,69 (m, 2H,  $\text{H}_{4'}$ ) ; 1,59-1,48 (m, 6H,  $\text{H}_{14', \text{H}_{B7, B9}}$ ) ; 1, 25 (m, 2H,  $\text{H}_{B8}$ ).

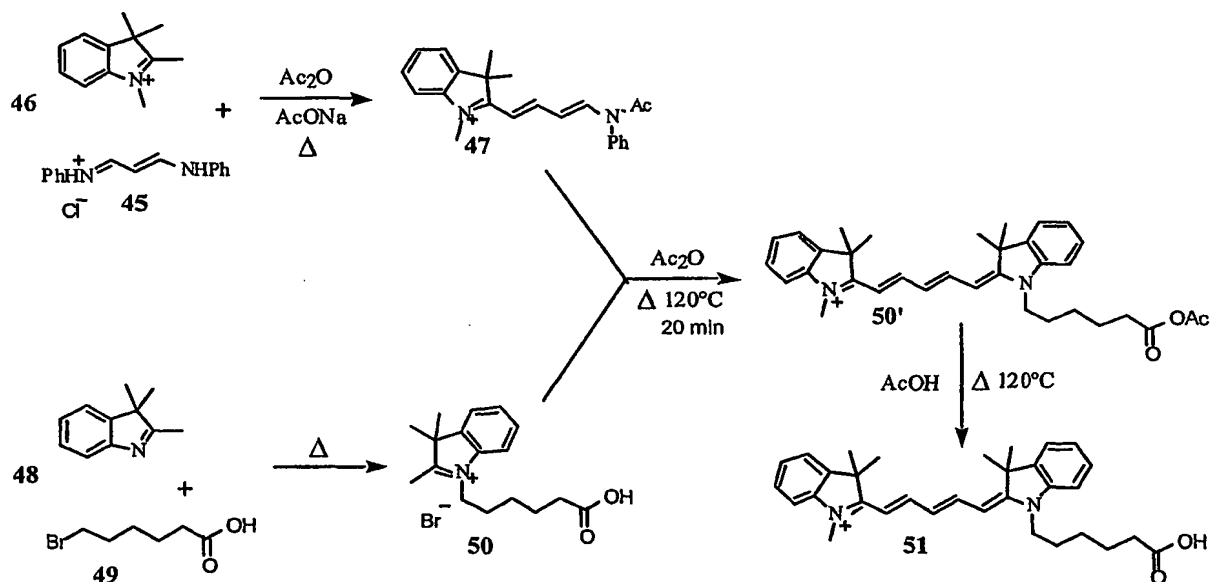
30

La stabilité du produit est supérieure à 1 mois à  $-20^\circ\text{C}$ .

**Exemple 31 : Synthèse du *para*-Cy5-EG3-PDAM :**

Comme cela a déjà été évoqué dans l'exemple 2, la biotine peut être remplacée par un autre marqueur tel que le Cy5. Cet exemple montre que l'on peut également relier la fonction diazo, portée par le PDAM, à ce marqueur Cy5 par l'intermédiaire d'un bras de liaison polyéthylène glycol.

Schéma de synthèse : Le contre ion  $\Gamma^-$  n'est pas représenté sur les formules 46, 47, 50' et 51.



● Iodure de 2-[4-(N-acétyl-N-phénylamino)buta-1,3-diényl]-1,2,3,3-tétraméthyl[3H]indolium  
**47 :**

Le mélange du monochlorhydrate de malonaldehyde-bis(phénylimine) 45 (13 g ; 50,2 mmol), de NaOAc (6,0 g ; 69,7 mmol) et de l'iodure de 1,2,3,3- tétraméthyl[3H]indolium 46 (3,01 g ; 10 mmol) dans de l'anhydride acétique (50 mL) est chauffé à 100 °C pendant 20 min précisément. Après refroidissement, on ajoute de l'éther (350 mL) et le solide brun précipité est filtré, lavé avec de l'éther (3 × 100 mL). Le solide est redissout dans 150 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,

filtré (élimination des sels minéraux) puis précipité avec 350 mL d'éther pour donner un solide brun (3,54 g, 54 %).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 8,64 (d ; 1H ;  $J$  = 12 Hz ; 1-H) ; 8,14 (t ; 1H ;  $J$  = 16 ; 12 Hz ; 3-H) ;  
5 7,63-7,19 (m ; 9H) ; 6,90 (d ; 1H ;  $J$  = 15 Hz ; 4-H) ; 5,82 (t ; 1H ;  $J$  = 12 ; 13 Hz ; 2-H) ; 4,06  
(s ; 3H ;  $\text{NCH}_3$ ) ; (2,16 (s ; 3H ;  $-\text{COCH}_3$ ) ; 1,74 (s ; 6H ;  $\text{CH}_3$ ).

● Bromure de 1-(5-carboxypentyl)-2,3,3-triméthyl[3H]indolium 50 :

10 On mélange le 2,3,3-triméthylindole 48 (10,0 g ; 62,8 mmole) et l'acide 6-bromohexanoïque  
49 (12,3 g ; 62,8 mmole) sans solvant et chauffe à 110 °C pendant 12 h sous argon. Le  
mélange réactionnel pâteux rouge violet est lavé avec de l'acétate d'éthyle (2 × 60 mL, on  
triturer la pâte avec la spatule et on décante le surnageant), puis avec de l'acétone (50 mL, la  
pâte solidifie). Le solide rose est filtré puis séché sous vide (16,0 g ; 73 %).

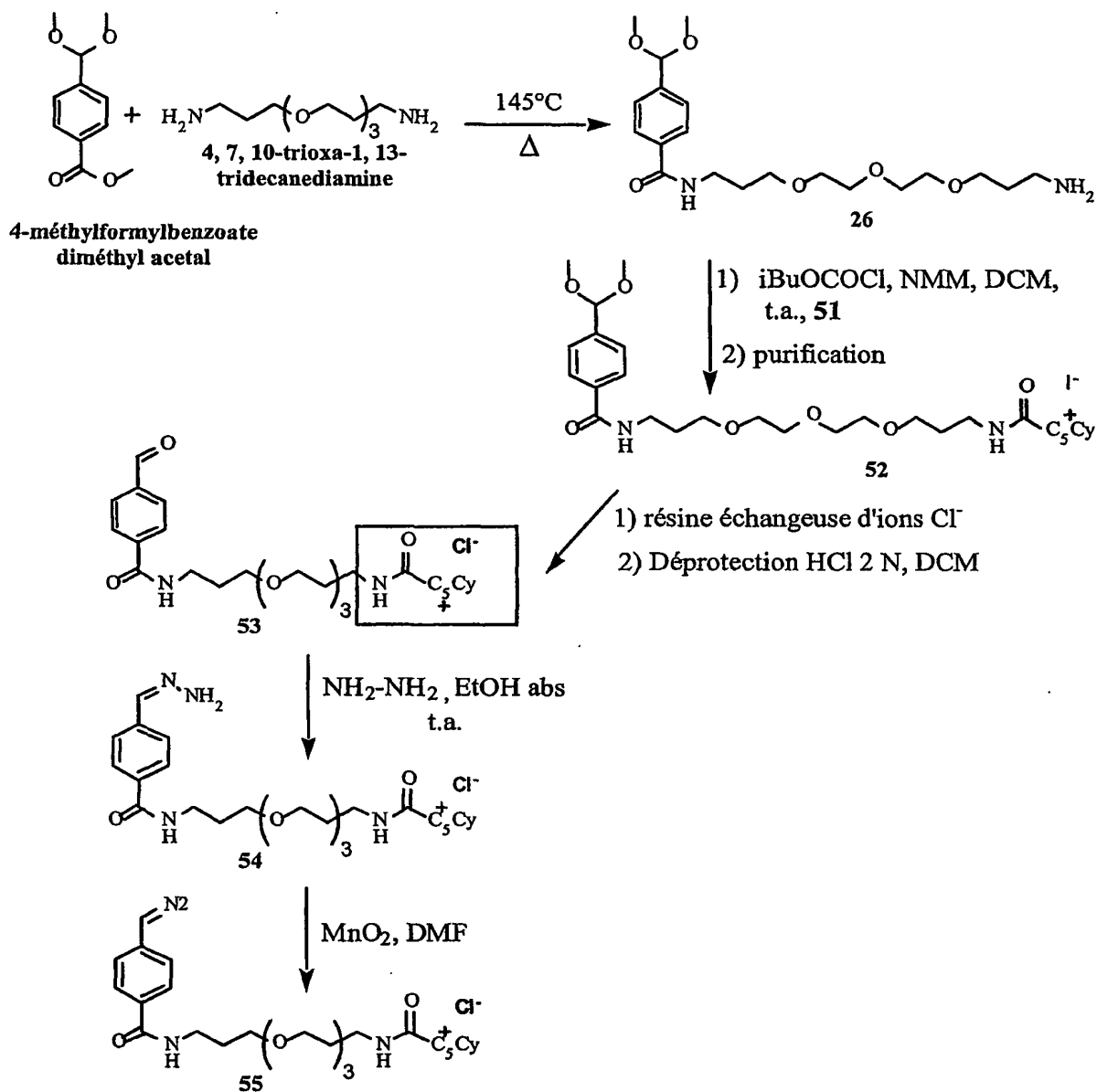
15

● Composé Cy5COOH 51 :

Le mélange de l'iodure 47 (2,5 g ; 5,3 mmole), du bromure 50 (1,87 g ; 5,3 mmole) et de  
 $\text{NaOAc}$  (1,08 g ; 12,1 mmole) dans de l'anhydride acétique (11 mL) est chauffé à 120 °C  
20 pendant 25 min. Après refroidissement, on ajoute de l'éther (200 mL) et le précipité est filtré  
et lavé avec de l'éther (3 × 50 mL). Le solide correspondant au produit 50' est dissous dans  
100 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  puis évaporé. On le dissout ensuite dans 15 mL d'acide acétique et l'on  
agite pendant 30 min à 120 °C. Le précipité correspondant au produit 51 est ainsi obtenu après  
ajout de 200 mL d'éther et filtration sur fritté, avec un rendement de 84 % (2,71 g ; 4,44  
25 mmol).

25

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 8,03 (t ; 2H ;  $J$  = 10 ; 11 Hz, 2-H, 4-H) ; 7,38-6,91 (m ; 9H ; Ar-H, 3-  
H) ; 6,41 (d ; 1H ;  $J$  = 14 Hz ; 1-H) ; 6,31 (d ; 1H ;  $J$  = 13 Hz ; 5-H) ; 4,07 (t ; 2H,  $J$  = 7 ; 7  
Hz ;  $\alpha\text{-CH}_2$ ) ; 3,68 (s ; 3H ;  $\text{NCH}_3$ ) ; 2,47 (t ; 2H,  $J$  = 7 ; 7 Hz ;  $\varepsilon\text{-CH}_2$ ) ; 1,71 (m ; 18H ;  $\text{CH}_3$ ,  
30  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta\text{-CH}_2$ ).



● Couplage du composé 26 avec le Cy5COOH 51 (produit 52) :

5

À une solution de Cy5COOH 51 (1,5 g ; 2,46 mmole) dans 15 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, on ajoute *N*-méthylmorpholine (NMM, 405 µL ; 3,68 mmole). La solution est refroidie avec un bain de glace et mise sous argon, puis on ajoute le chloroformiate d'isobutyle (494 µL ; 3,81 mmole).

Après 10 min d'agitation, on additionne l'amine **26** (1,86 mg ; 4,67 mmole) diluée dans 8 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. On laisse le mélange sous agitation à température ambiante pendant 1 h 30. On ajoute 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et on lave avec 25 mL de NaHCO<sub>3</sub> 1 N trois fois de suite. Après séchage sur Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, on filtre la solution pour récupérer la phase dichlorométhane que l'on évapore.

Une purification sur colonne par chromatographie-flash (colonne de 45 mm de diamètre, fractions de 20 mL)) est réalisée avec comme éluant du MeOH-DCM 10% . Les fractions correspondant au produit **52** sont rassemblées puis évaporées à sec pour donner un solide bleu qui est dissous dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le produit **52** est alors précipité et lavé à l'éther pour donner un produit bleu avec un rendement de 72 % (1,45 g ; 1,77 mmol).

Le produit **52** (iodure) est ensuite dissous dans 54 mL de méthanol puis passé sur colonne d'amberlite IRA900 (Cl<sup>-</sup> ; 15 g). La solution méthanolique recueillie est évaporée à sec pour donner une huile collante que l'on redissout dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> . L'évaporation permet l'obtention du produit **52'** avec un rendement de 87 %.

● Aldéhyde 53 :

L'acétal **52'** est dissous dans 10 mL de DCM, puis 10 mL de HCL 2N sont ajoutés. La solution est laissée sous forte agitation pendant 3h 30 min. Après ajout de 20 mL de DCM, la phase dichlorométhane est récupérée puis séchée sur NaHCO<sub>3</sub>. Le produit obtenu après évaporation est lavé avec de l'éther pour donner l'aldéhyde **53** avec un rendement de 90 % (1,18g ; 1,46 mmol).

● Hydrazone 54 :

On dissout l'aldéhyde **53** (200 mg ; 0,247 mmole) dans 1 mL d'éthanol absolu et on ajoute l'hydrazine monohydratée (15,6 µL ; 0,321 mmole). La solution est agitée à température ambiante pendant 30 min. On ajoute 8 mL d'éther ; on lave à l'éther par décantation, trois fois de suite puis on sèche sous vide. On obtient 172 mg d'hydrazine **54** (0,209 mmol ; 85 % de rendement) que l'on conserve au congélateur.

● Diazo 55 :

À une solution de 20 mg (0,243 mmol) d'hydrazone **54** dans 2 mL de DMF, on ajoute 100 mg de MnO<sub>2</sub> et agite vigoureusement pendant 5 min sous argon à température ambiante. On filtre  
5 la suspension à travers une couche du célite (épaisseur : 2 cm) et du tamis moléculaire en poudre 3 Å (0,5 cm) et lave avec DMF. On évapore la solution puis on triture à l'éther. Le solide ainsi obtenu est séché. On obtient 18 mg (0,185 mmol ; 76%) de diazo **55**.

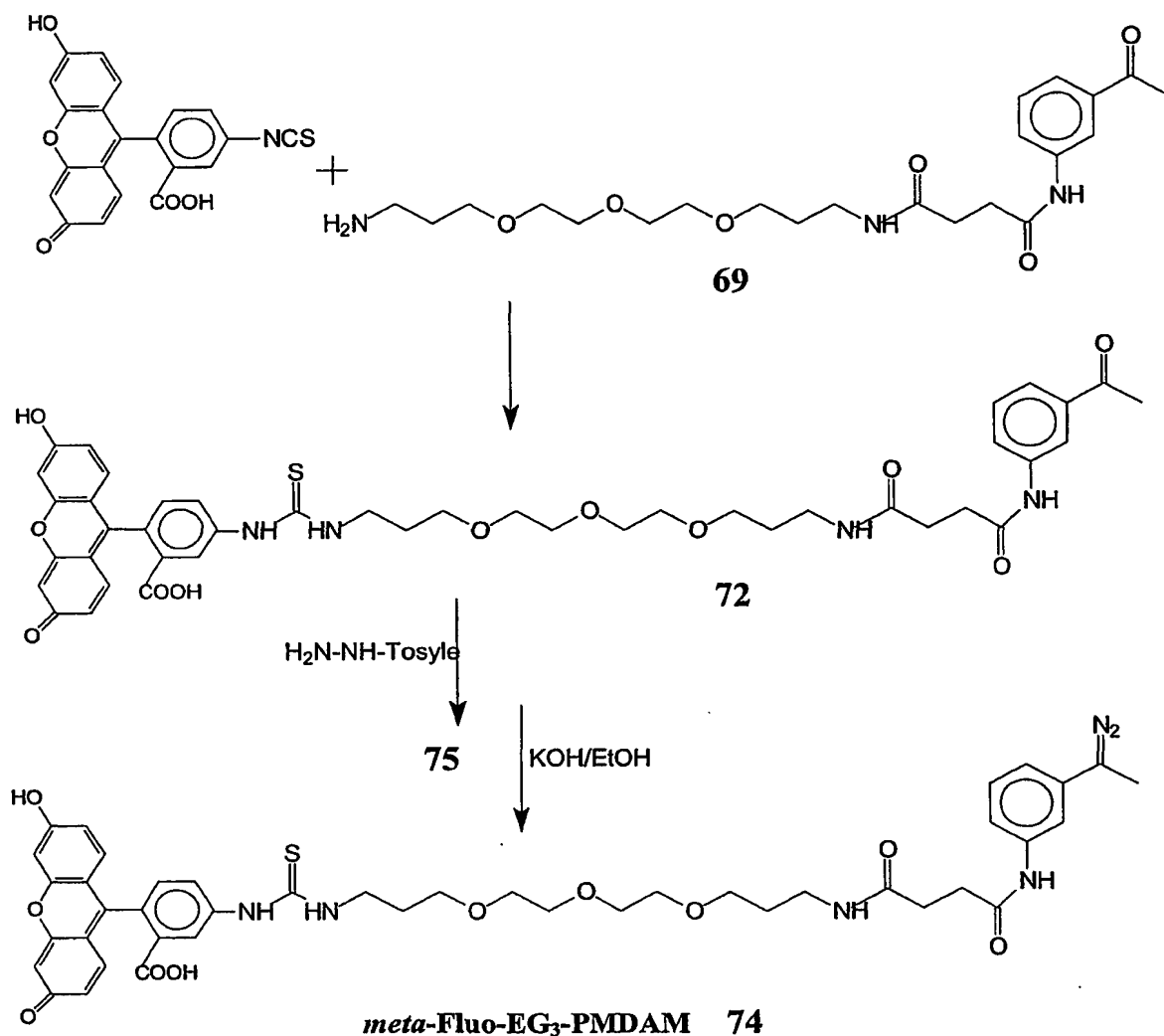
La stabilité du réactif est supérieure à 1 mois à -20°C.

10

**Exemple 32 : Synthèse du *mé*ta-Fluo-EG3-PMDAM :**

Comme cela a déjà été évoqué dans les exemples 23 et 25, la biotine peut être remplacée par un autre marqueur tel que la fluorescéine. Cet exemple montre que l'on peut également relier  
15 la fonction diazo, portée par le PMDAM, à ce marqueur fluorescéine par l'intermédiaire d'un bras de liaison polyéthylène glycol.

Schéma de synthèse :



Composé 72 :

- On solubilise l'isothiocyanate de fluorescéine- (250 mg, 0,64 mmol) dans 1,6 ml de DMF anhydre, avec 2% de pyridine, sous argon. On ajoute le produit **69** (0,356 g, 0,81 mmol) dissout dans 1,6 ml de DMF anhydre. On laisse réagir 3,5 h à température ambiante, puis on évapore le DMF et on reprend dans 25 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . On fait trois extractions avec 50 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , et la phase aqueuse est évaporée. On obtient 255 mg (48%) du produit **72**.

Composé *mé*ta-Fluo-EG<sub>3</sub>-Hydrazone-Tosyle 75 :

On dissout le composé 72 (255 mg, 0,31 mmol) dans 1,5 ml d'éthanol à reflux. On ajoute la *p*-toluen-sulfonyl-hydrazine (69,2 mg, 0,37 mmol) dans 1,5 ml d'éthanol et on laisse réagir  
5 pendant 6 h. On évapore a sec, et on lave le solide avec CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O et éther. On obtient 18,5 mg (74%) du produit 75 sous forme d'une poudre orange.

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1,6-1,8 (m, 4H); 2,13 (s, 1H); 2,28 (s, 1H); 2,36 (s, 1H); 2,80 (m, 1H); 3,07 (m, 2H); 3,46 (m, 12H); 6,5-6,7 (m, 6H); 7,1-8,3 (m, 9H).

10 Composé *mé*ta-Fluo-EG<sub>3</sub>-PMDAM 74 :

On solubilise l'hydrazone 75 (176 mg, 0,18 mmol) dans 720 µl d'une solution de KOH à 10% dans du méthanol anhydre. La solution est laissée a reflux pendant 3 h. On laisse refroidir la solution et un précipité apparaît. La solution est filtrée et évaporée a sec. Le résidu est lavé a  
15 l'éther et séché.

L'analyse par RMN montre la disparition des signaux a 2,36 et 2,13 ppm (correspondant aux Méthyles du tosyle et de l'hydrazone) et l'apparition d'un pic à 1,96 ppm (correspondant au méthyle du diazo).

20 Exemple 33 : Intermédiaire diazométhyle permettant un marquage ultérieur :

Il peut être intéressant d'avoir non pas un marquage direct par le réactif de marquage diazométhyle portant aussi le marqueur R<sup>2</sup> mais de procéder en deux étapes avec un marquage indirect. Dans ce cas le réactif de marquage comprenant la fonction diazométhyle est dit  
25 préfonctionnalisé c'est à dire qu'il comprend aussi une fonction chimique apte à réagir ultérieurement avec des marqueurs directs ou indirects. La pré-fonctionnalisation peut intervenir par introduction d'une fonction réactive de covalence au sein du réactif de marquage qui peut réagir avec une fonction anti-réactive de covalence du marqueur direct ou indirect. Ces fonctions peuvent être constituées par une fonction chimique organique  
30 électrophile et une fonction chimique organique nucléophile, ou inversement.

Un exemple d'une telle stratégie de marquage est illustrée par le schéma ci-dessous





Dans lequel le réactif de marquage comprend, outre une fonction diazométhyle, une fonction  $\text{W}^1$  électrophile ou nucléophile susceptible de réagir avec un marqueur  $\text{R}^2$  comprenant une fonction  $\text{W}^2$  complémentaire de  $\text{W}^1$ .

- 5 Par exemple si  $\text{W}^1$  est une fonction méthylcétone ou aldéhyde,  $\text{W}^2$  est une fonction alcoxyamine.

Dans un procédé de marquage d'une molécule biologique comme un acide nucléique, l'acide nucléique est mis en contact avec le réactif de marquage coprenant la fonction diazométhyle et dans une étape ultérieure, le marqueur  $\text{W}^2-\text{R}^2$  réagit avec l'acide nucléique par l'intermédiaire

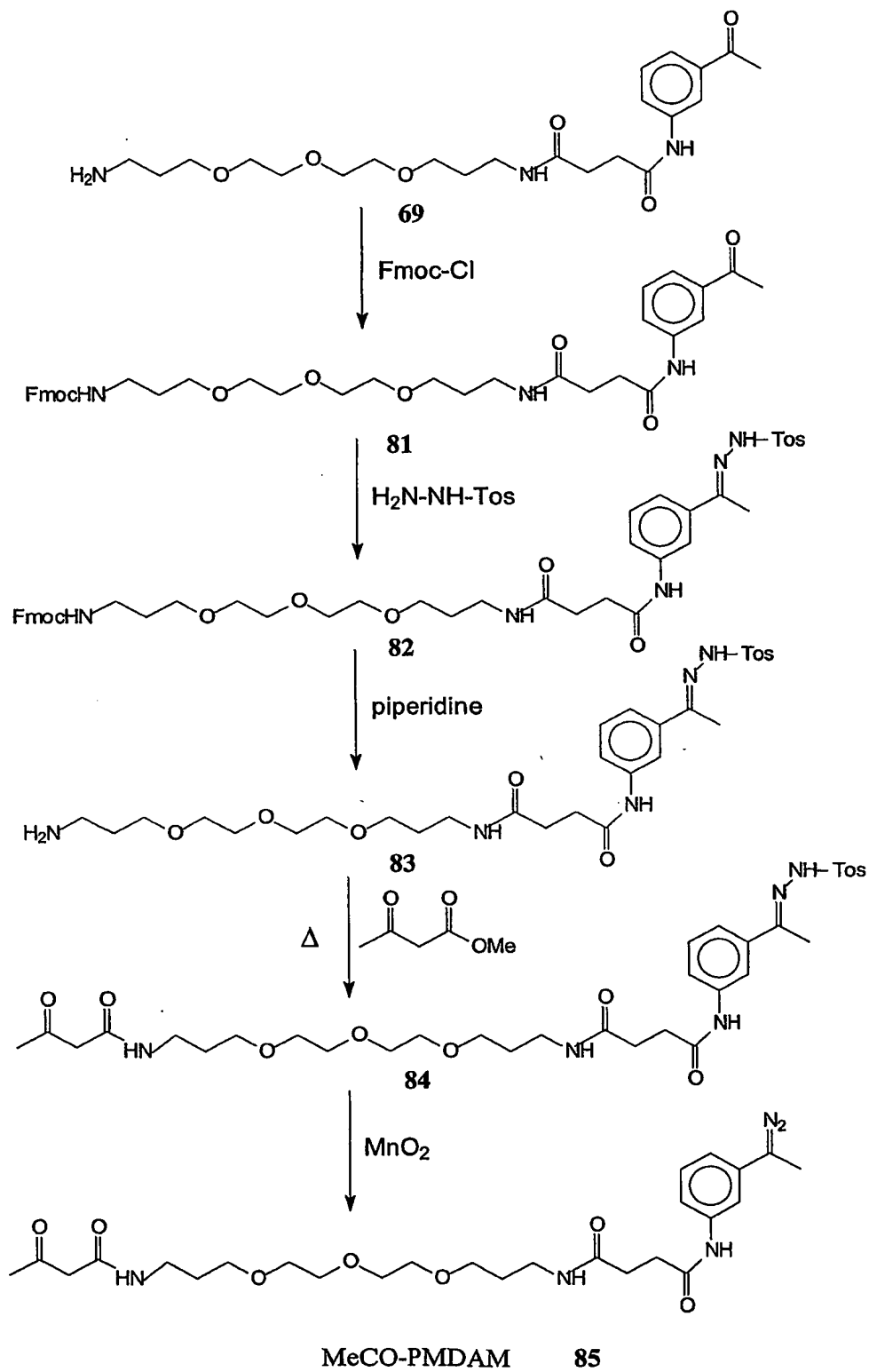
10 de la fonction  $\text{W}^1$ .

L'une des utilisations est par exemple constituée par un procédé d'amplification d'une séquence d'un acide nucléique ou par un procédé d'amplification du signal. Des informations complémentaires sur ce type de marquage peuvent être trouvées dans la demande de brevet WO-A-98/05766, sous priorité du 2 août 1996. et dans la demande de brevet WO-A-00/40590

15 sous priorité du 05 Janvier 1999.

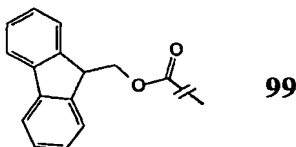
### Exemple 33.1 : Synthèse du MeCO-PMDAM :

20 Schéma de synthèse :



Le produit **85**, dont la synthèse est décrite dans cet exemple, permet de réaliser le marquage des acides nucléiques naturels, grâce à la réactivité de la fonction diazométhyl avec les groupements phosphate, et d'introduire ainsi une fonction méthylcétone, qui peut être utilisée par la suite pour introduire une molécule détectable (fluorescente, biotine) possédant un groupement alcoxyamine.

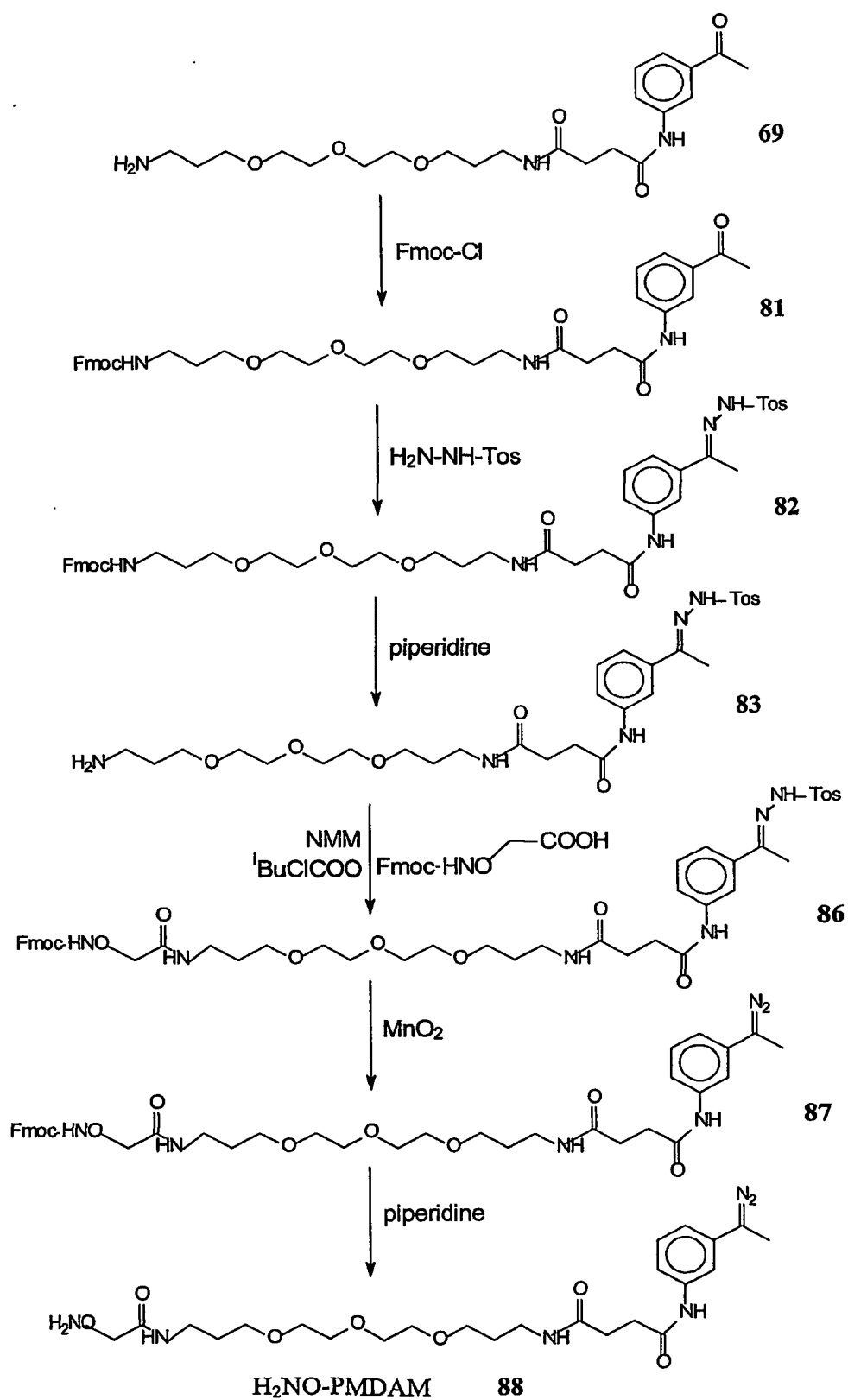
Cette synthèse est basée sur des méthodes connues et utilisées en routine en chimie. Le produit de départ est le même que pour la synthèse des marqueurs **71** et **74**. La première étape consiste en la protection de l'amine terminale par le Fluorenylmethyl-formate (Fmoc, **99**). Le choix de ce groupement protecteur est basé sur sa stabilité et conditions de clivage.



Après formation de l'hydrazone protégée **82** par la méthode utilisée précédemment (exemple *mé*ta-Fluo-EG<sub>3</sub>-PMDAM, ), l'amine terminale est déprotégée dans des conditions basiques douces qui garantissent la stabilité de l'hydrazone. L'acétoacétate de méthyle est utilisé pour créer la fonction méthylcétone par une réaction d'acylation de l'amine terminale (voir formation des composés **26** et **36**). La formation du diazométhyl est ensuite réalisée par l'une des méthodes décrites précédemment.

### Exemple 33.2 : Synthèse du H<sub>2</sub>NO-PMDAM :

Schéma de synthèse :



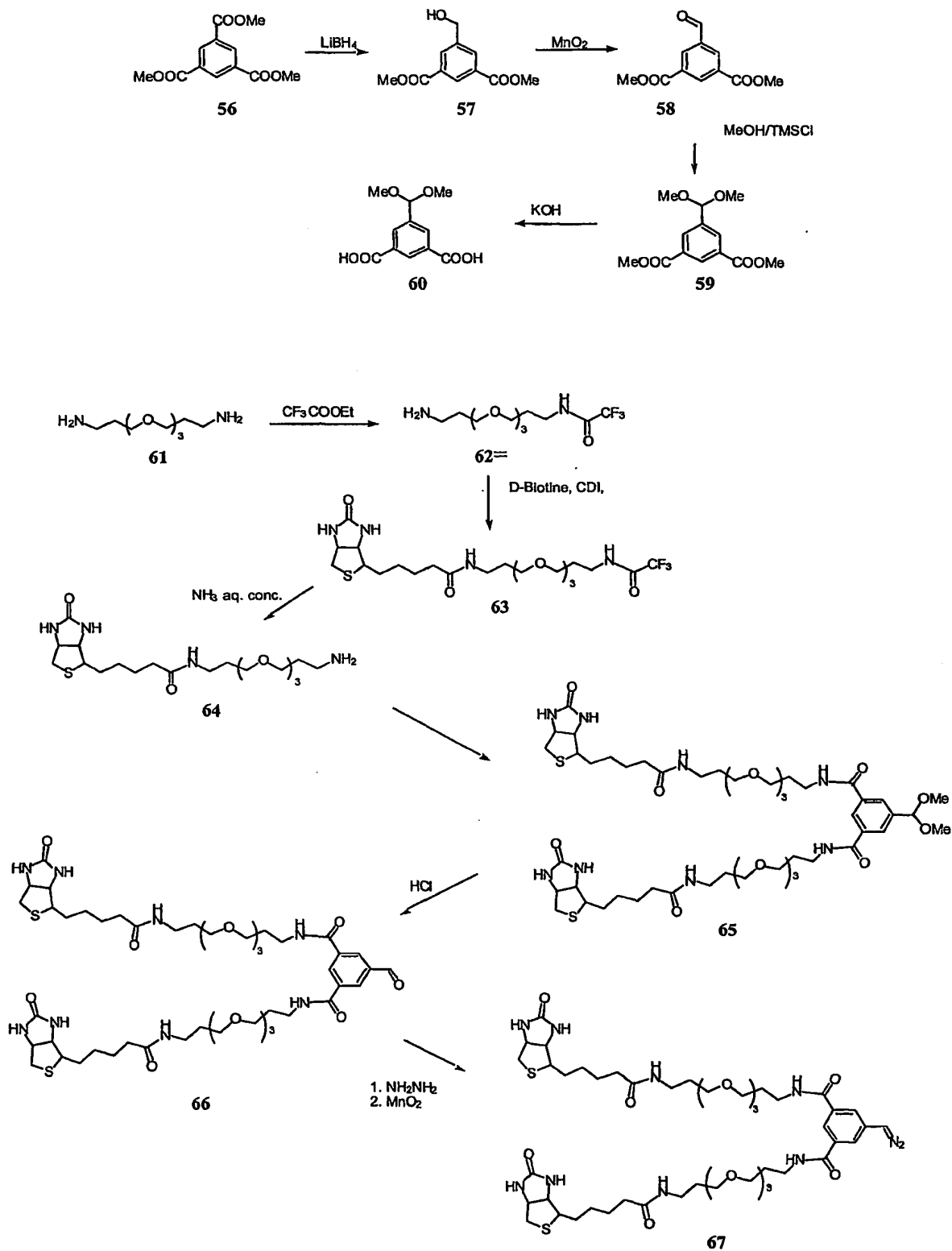
Le produit **88**, dont la synthèse est décrite dans cet exemple, permet de réaliser le marquage des acides nucléiques naturels, grâce à la réactivité de la fonction diazométhyl avec les groupements phosphate, et d'introduire ainsi une fonction alcoxyamine, qui peut être utilisée par la suite pour introduire une molécule détectable (fluorescente, biotine) possédant un groupement méthylcétone.

Cette synthèse est basée sur le modèle de la précédente, c'est-à-dire l'utilisation du précurseur **69**, du Fmoc pour la protection de l'amine et du tosyle pour la protection de l'hydrazone. L'introduction de la fonction alcoxyamine (composé **86**) se fait par l'usage du carboxyméthoxylamine (commercial) protégé par la fonction Fmoc (Thèse E. Trévisiol, LEDSS Grenoble, 1999). Etant donné les conditions douces de la déprotection finale (composé **88**), celle-ci est réalisée de suite après la formation du diazométhyl.

#### **Exemple 34 : Préparation de dérivés PDAM permettant l'amplification du signal :**

**Exemple 34.1 : Synthèse de marqueurs bis-biotinylés tels que le [Bio-EG3]2-PDAM :**

**Schéma de synthèse :**



● Réduction du benzène-1,3,5-tricarboxylate de triméthyle 56 en alcool 57 :

On dissout le triester 56 (12,6 g ; 50,0 mmol) dans 100 mL de THF puis ajoute 1,1 g (50,5 mmol) de  $\text{LiBH}_4$  à température ambiante. La solution rouge est chauffée à 40-45°C sous agitation sous argon pendant 1 h. Après refroidissement (glace), on détruit l'hydrure en excès avec précaution (dégagement de  $\text{H}_2$ ) par l'addition d'eau (200 mL) puis de  $\text{HCl}$  2N (30 mL). On observe le virage de couleur en jaune claire. On extrait cette solution avec  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100mL puis 3 fois 50 mL), la phase organique est lavée avec  $\text{NaHCO}_3$  anhydre, séchée sur  $\text{MgSO}_4$  puis le solvant est évaporé jusqu'à l'obtention d'une huile (11,1 g). Par chromatographie flash sur colonne de silice (diamètre = 40 mm, éluant : acétate d'éthyle/cyclohexane = 1/1), on obtient l'alcool 57 (6,38 g, 57 %).

RMN  $^1\text{H}$  ( 200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 8,53(t, 1H,  $J$  = 2 Hz) ; 8,18 (d, 2H,  $J$  = 2 Hz) ; 4,76 (s, 2H) ; 3,91 (s, 6H) ; 2,30 (s, 1H).

● Oxydation de l'alcool 57 en aldéhyde 58 :

On dissout l'alcool 57 (5,86 g ; 26,1 mmol) dans 100 mL de THF puis ajoute 40,0 g de  $\text{MnO}_2$  petit à petit en 5 min à température ambiante. La solution est laissée une nuit sous agitation sous argon. On filtre la solution à travers un entonnoir Büchner muni d'une couche de Célite 545, on lave avec  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  puis évapore les solvants. Le solide brut (4,4 g) est purifié par chromatographie flash sur une colonne de silice (diamètre = 50 mm, éluant : acétate d'éthyle/cyclohexane 3/7). On obtient 3,44 g (59 %) de l'aldéhyde 58.

RMN  $^1\text{H}$  ( 200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 10,11 (s, 1H) ; 8,89(t, 1H,  $J$  = 1 Hz) ; 8,69 (d, 2H,  $J$  = 1 Hz) ; 3,98 (s, 6H).

● Formation de l'acétal 59 :

On dissout l'aldéhyde 58 (3,21 g ; 14,4 mmol) dans 30 mL de méthanol puis ajoute 6,0 mL de  $\text{TMSCl}$ . La solution est laissée à température ambiante sous agitation sous argon pendant 1 h.

On dilue la solution avec 200 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , et agite avec 1 M  $\text{NaHCO}_3$  (100 mL) (attention dégagement de  $\text{CO}_2$ ). On sépare les deux phases, extrait la phase aqueuse trois fois avec  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 mL), on rassemble les phases organiques, on sèche sur  $\text{MgSO}_4$  puis évapore le solvant. On obtient 3,55 g (92 %) de l'acétal **59**.

- 5 RMN  $^1\text{H}$  ( 200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 8,63(t, 1H,  $J$  = 2 Hz) ; 8,29 (d, 2H,  $J$  = 2 Hz) ; 5,45 (s, 2H) ; 3,93 (s, 6H) ; 3,32 (s, 6H).

● Hydrolyse du diester **59** en diacide **60** :

- 10 On dissout le diester **59** (3,18 g ; 11,9 mmol) dans 10 mL de THF puis ajoute une solution de KOH (2,0 g, pastille 85 %) dans 10 mL de méthanol. Après 15 min à température ambiante, on évapore les solvants. Le résidu est dissous dans  $\text{H}_2\text{O}$  (50 mL). On ajoute  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (environ 2,5 mL, 85 %) jusqu'à pH 3 et le précipité blanc est filtré sur le fritté (#3), lavé avec de l'eau et séché sous vide. On obtient 2,59 g (91 %) du diacide **60**.

15

RMN  $^1\text{H}$  ( 200 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) :  $\delta$  = 8,43 (t, 1H,  $J$  = 1 Hz) ; 8,15 (d, 2H,  $J$  = 1 Hz) ; 5,53 (s, 1H) ; 3,27 (s, 6H).

● Trifluoracétamide **62** :

20

On dissout la diamine **61** (66 g ; 0,30 mol) dans 250 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  puis ajoute le trifluoracétate d'éthyle (11,8 mL, 0,10 mol) goutte à goutte en 5 min à 10 °C sous agitation sous argon. Après 15 min à température ambiante, on transfère la solution dans une ampoule à décanter, on lave avec  $\text{H}_2\text{O}$  (3  $\times$  100 mL), on sèche sur  $\text{MgSO}_4$  et évapore le solvant. On obtient 22,4 g (71 %) du monoamide **62** de pureté d'environ 85 % (déterminée par  $\text{F}^{19}$  RMN). Ce composé est conservé à -20 °C et utilisé sans purification.

25

RMN  $^1\text{H}$  ( 200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 3,5-3,6 (m, 12H) ; 3,42 (t, 2H,  $J$  = 6 Hz) ; 2,75 (t, 2H,  $J$  = 6 Hz) ; 1,81 (quantiplot, 2H,  $J$  = 6 Hz) ; 1,67 (quantiplot, 2H,  $J$  = 6 Hz) ; 1,30 (s. large, 2H).

30

RMN  $^{19}\text{F}$  ( 190 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = -76,3.



● Composé 63 :

A une suspension de D-biotine (6,39 g ; 26,2 mmol) dans 50 mL de DMF, on ajoute le  
5 carbonyldiimidazole (CDI, 6,32 g , 80 %, 31,2 mmol). Le mélange est chauffé à 55-60 °C  
sous agitation sous argon pendant 30 min. On observe initialement une dissolution complète  
de matériel puis une prise en masse avec une précipitation de solide blanc (CO<sub>2</sub> évolution).  
On ajoute l'amine (huile) à l'aide de 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pour rincer et le mélange est chauffé à  
55-60 °C pendant 3 h. On évapore le DMF sous vide (< 1 mmHg) et le résidu est agité avec  
10 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (700 mL) et 2N HCl (100 mL). Après une filtration des deux phases à travers une  
couche de Célite 545, on sépare les phases, la phase aqueuse est extraite avec CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 ×  
100 mL), les phases organiques sont rassemblées, séchées sur NaHCO<sub>3</sub> anhydre et MgSO<sub>4</sub>,  
puis le solvant est évaporé. Le résidu huileux est trituré avec 150 mL d'éther pour obtenir une  
suspension. Le solide pâteux est difficile à filtrer. On décante le surnageant et on répète le  
15 lavage à l'éther. Après séchage sous vide, on obtient 9,13 g (64 %) de composé 63.  
RMN <sup>1</sup>H ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 3,5-3,6 (m, 12H) ; 3,42 (t, 2H, J = 6 Hz) ; 2,75 (t, 2H, J = 6  
Hz) ; 1,81 (quantiplot, 2H, J = 6 Hz) ; 1,67 (quantiplot, 2H, J = 6 Hz) ; 1,30 (s. large, 2H).

● Composé 64 :

20

On chauffe une solution du composé 63 dans l'ammoniaque (100 mL, 22 % aqueuse) dans un  
ballon de 250 mL bouché avec un septum à 55-60 °C pendant 2 h. Après refroidissement, on  
évapore le solvant. Le résidu est dissous dans le méthanol (20 mL) et passé sur une colonne  
résine échangeuse d'anion Dowex 21K [hauteur 12 cm × diamètre 35 mm, forme OH<sup>-</sup> obtenu  
25 par lavage préalable avec NaOH 1N (1,5 L) puis H<sub>2</sub>O (1,5 L) puis méthanol (1,5 L)]. Le  
composé 64 libre de l'ion trifluoracétate passe dans les premières fractions avec 200 mL du  
méthanol. Après évaporation, on triture le résidu avec 50 mL d'éther puis on le décante. Le  
lavage à l'éther est répété cinq fois de suite. Après séchage, on obtient le composé 64 (6,43 g,  
86 %).

30

RMN  $^1\text{H}$  ( 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 6,77 (t, 1H,  $J$  = 4 Hz) ; 6,32 (s, 1H) ; 5,52 (s, 1H) ; 4,45 (m, 1H) ; 4,28 (m, 1H), 3,50-3,68 (m, 12H) ; 3,30 (m, 2H), 3,11 (m, 1H) ; 2,86 (dd, 1H,  $J$  = 13 et 5 Hz), 2,75 (t, 2H,  $J$  = 13 Hz), 2,68 (d, 1H,  $J$  = 13 Hz) ; 2,16 (t, 2H,  $J$  = 7 Hz) ; 1,60-1,85 (m, 8H) ; 1,41 (m, 2H).

5

● [Bio-EG<sub>3</sub>]<sub>2</sub>- acétal 65 :

A une suspension du diacide 60 (120 mg ; 0,500 mmol) dans le dichloroéthane (5 mL), on ajoute le carbonyldiimidazole (225 mg, 90 %, 1,25 mmol) et on chauffe à 55-60 °C pendant 10 30 min sous agitation sous argon. On ajoute l'amine 64 (550mg ; 1,23 mmol) et la solution est chauffée à 55-60 °C pendant 6 h. Après évaporation, on passe sur une colonne de silice (diamètre : 25 mm, éluant : méthanol 15-30 % dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). On obtient 413 mg (75 % ) de composé 65.

15 RMN  $^1\text{H}$  ( 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 8,34 (s, 1H) ; 8,06 (s, 2H) ; 7,87 (m, 2H) ; 6,85 (m, 2H) ; 6,60 (s, 2H) ; 5,93 (s, 2H) ; 5,40 (s, 1H) ; 4,45 (m, 2H) ; 4,27 (m, 2H), 3,43-3,68 (m, 24H) ; 3,31 (s, 6H) ; 3,25 (m, 4H), 3,08 (m, 2H) ; 2,83 (dd, 2H,  $J$  = 13 et 5 Hz), 2,70 (t, 2H,  $J$  = 13 Hz) ; 2,13 (t, 4H,  $J$  = 7 Hz) ; 1,89 (quintuplet, 4H,  $J$  = 7 Hz) ; 1,55-1,70 (m, 12H) ; 1,37 (m, 4H).

20

● [Bio-EG<sub>3</sub>]<sub>2</sub>- aldéhyde 66 :

L'acétal 65 (413 mg ; 0,376 mmol) en solution dans le méthanol est traité avec HCl 2N (0,5 mL). Après évaporation et lavage avec l'éther, on obtient l'aldéhyde 66 (0,37 g, 90 %).

25 RMN  $^1\text{H}$  ( 300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) :  $\delta$  = 10,11 (s, 1H) ; 8,82 (t, 2H,  $J$  = 6 Hz) ; 8,62 (s, 1H) ; 8,47 (s, 2H) ; 7,73 (t, 2H,  $J$  = 5 Hz) ; 4,30 (m, 2H) ; 4,11 (m, 2H), 3,30-3,60 (m, 24H) ; 3,06 (m, 6H) ; 2,80 (dd, 2H,  $J$  = 12 et 5 Hz), 2,56 (t, 2H,  $J$  = 12 Hz) ; 2,03 (t, 4H,  $J$  = 7 Hz) ; 1,78 (quintuplet, 4H,  $J$  = 7 Hz) ; 1,35-1,60 (m, 12H) ; 1,28 (m, 4H).

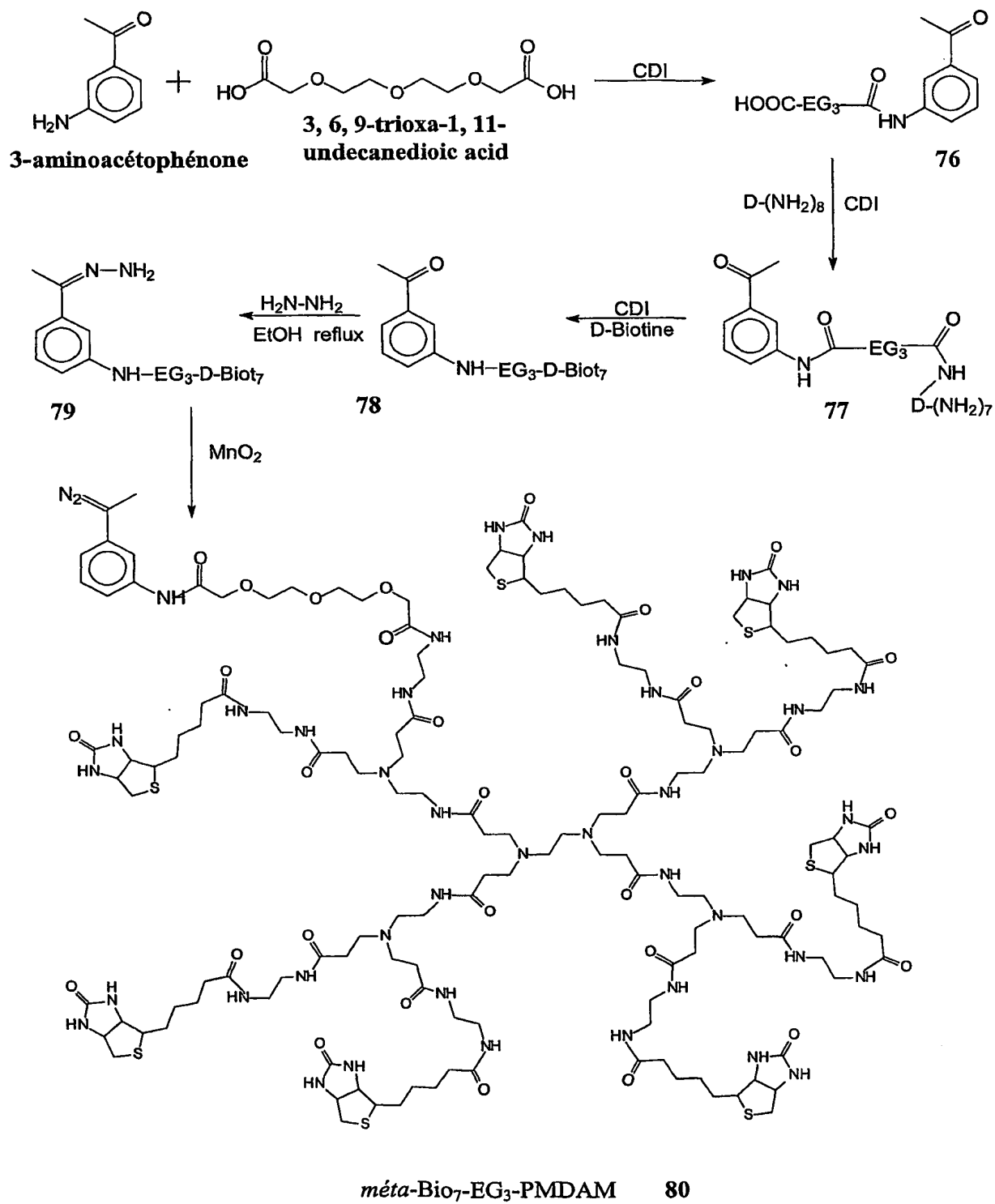
● [Bio-EG<sub>3</sub>]<sub>2</sub>-PDAM 67 :

L'aldéhyde 66 est transformé en diazométhane 67 selon la méthode utilisée pour la préparation des diazométhanes (Exemple 1).

- 5 La stabilité du réactif est supérieure à 1 mois à -20°C.

**Exemple 34.2 : Synthèse du *méta*-Bio7-EG3-PMDAM :**

Schéma de synthèse :



Composé EG<sub>3</sub>-acétophénone 76 :

Le 3, 6, 9-trioxa-1, 11-undecanedioic acid (EG<sub>3</sub>, 12,64 ml, 74 mmol) est dissout dans 80 ml de DMF anhydre sous argon et refroidit dans un bain de glace. Le dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 11,45 g, 55,5 mmol) est ensuite dissout dans 20 ml de DMF anhydre et ajouté  
5 lentement. Après 30 min, on ajoute le 3-aminoacétophénone (5,0 g, 37 mmol) et on laisse réagir 1 h à température ambiante sous argon. Le DMF est ensuite évaporé sous vide et 70 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont ajoutés. La solution est filtrée et extraite avec 3x25 ml d'acide acétique 1%. Les phases aqueuses sont réunies et lavées avec 25 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les phases organiques sont  
10 mélangées, séchées avec du sulfate de sodium anhydre et évaporées à sec. Le produit est recristallisé dans le couple MeOH:H<sub>2</sub>O. On obtient ainsi 8,74 g (70%) du produit 76.

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 2,55 (s, 3H); 3,5-3,7 (m, 8H); 4,0 (s, 2H); 4,1 (s, 2H); 7,45 (t, 1H); 7,65 (d, 1H); 7,90 (d, 2H); 8,2 (s, 1H); 9,8 (s, 1H).

15

Composé (NH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-EG<sub>3</sub>-acétophénone 77 :

Le produit 76 (120mg, 0,35 mmol) est dissout dans 15 ml de DMF anhydre sous argon, refroidit sur glace, et le DCC (110 mg, 0,53 mmol) est ensuite ajouté. Après 30 min, on ajoute  
20 cette solution sur une solution du dendrimère commercial « Starburst PAMAM Dendrimer, Generation 1 » (Aldrich, St Quentin Fallavier) (1 g, 0,71 mmol, dans 5 ml de méthanol), lentement et sous forte agitation. On laisse réagir 1 h à température ambiante et on évapore. Le résidu est repris dans 10 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et extrait deux fois avec 30 ml d'acide acétique 1%.

25 Composé Biot<sub>7</sub>-EG<sub>3</sub>- acétophénone 78 :

La D-Biotine (1,73 g, 7,08 mmol) est solubilisée dans 80 ml de DMF anhydre sous argon, et la solution est refroidie sur glace. On ajoute successivement la N-méthylmorpholine (NMM, 856 µl, 7,7 mmol) et le chloroformiate d'isobutyle (1022 µl, 7,7 mmol). Après 30 min, on ajoute le  
30 produit 77 (1,13 g, 0,7 mmol, dans 5 ml de méthanol) et on laisse réagir 3 h sur glace et sous argon. On concentre sous vide jusqu'à 50 ml et on ajoute 100 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> . Un précipité se

forme, qui est filtré, lavé à l'éther, et séché sous vide. On obtient 1,3 g de **78** sous forme d'une poudre blanche.

Composé Biot<sub>7</sub>-EG<sub>3</sub>-Hydrazone **79** :

5

Le composé **78** (300 mg, 0,09 mmol) est dissout dans 10 ml d'éthanol absolu à reflux. On ajoute l'hydrazine monohydrate (20 ml, 0,40 mmol) et on laisse réagir 3 h à reflux. Après refroidissement, un précipité se forme, qui est filtré, lavé à l'éther et séché sous vide. On obtient ainsi 109 mg (36%) du produit **79**, sous forme d'une poudre blanche.

10

Composé Biot<sub>7</sub>-EG<sub>3</sub>-PMDAM **80** :

On solubilise l'hydrazone **79** (100 mg, 0,03 mmol) dans 5 ml de DMF anhydre à 70°C. On laisse revenir à température ambiante et on ajoute le MnO<sub>2</sub> (31 mg, 0,36 mmol). On laisse réagir 10 min et on élimine l'oxyde de manganèse par filtration sur un fritté avec de la célite (0,5 cm et du tamis moléculaire en poudre (0,5 cm). Le filtrat est évaporé à sec, lavé à l'éther et séché sous vide. On obtient ainsi 78 mg (78%) du produit **80**.

Les dendrimères sont des molécules arborescentes possédant aux extrémités plusieurs groupements réactifs tels que des amines, carboxyles, hydroxyles ou autres (pour revue, voir Newcome et al, (1996) *Dendritic Molecules: Concept, Syntheses, Perspectives*. VCH Ed., Weinheim, Germany). La synthèse de ces molécules est aujourd'hui bien maîtrisée, et des nombreux dendrimères sont commercialisés par l'industrie chimique. Le choix du PAMAM (Sigma-Aldrich) a été fait sur la base de sa stabilité, solubilité et souplesse, puisque plusieurs versions de cette molécule, avec un nombre et type de terminaisons différentes, sont disponibles. Le "PAMAM Generation 1" permet d'ajouter sept molécules du marqueur (en une seule étape de synthèse) pour chaque groupement diazométhyl.

**Exemple 35 : Marquage et fragmentation en deux étapes d'amplicons ADN avec le *méta-BioPMDAM* :**

Les amplicons ADN ont été préparés par amplification PCR selon le protocole décrit dans l'exemple 5.1. Deux réactions de marquage ont été réalisées.

**a. Marquage et fragmentation en deux étapes :**

A 10  $\mu$ L de PCR sont ajoutés 10  $\mu$ L de *méta*-BioPMDAM (100 mM dans du DMSO) et 77  $\mu$ L d'eau Dnase/Rnase free. La solution est incubée 10 min à 95°C. Puis 3  $\mu$ L d'HCl à 0,1M sont ajoutés et la solution est incubée 10 min à 95°C.

**b. Marquage et fragmentation en une étape :**

A 10  $\mu$ L de PCR sont ajoutés 10  $\mu$ L de *méta*-BioPMDAM (100 mM dans du DMSO), 5  $\mu$ L d'HCl à 0,1 M et 75  $\mu$ L d'eau Dnase/Rnase free. La solution est incubée 30 min à 60°C. Le reste du protocole est identique à celui de l'exemple 17.

Résultats :

Protocole utilisé	Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
a. Marquage et fragmentation en deux étapes	99,5	14129	624	22,7
b. Marquage et fragmentation en une étape	98,9	4431	667	6,6

**Tableau 25 :** Etude comparative du marquage et de la fragmentation en deux étapes distinctes et en une seule étape

Comme le démontre le tableau 25, les résultats obtenus avec le protocole en une étape sont satisfaisants. Ceux obtenus avec un marquage et une fragmentation en deux étapes sont encore meilleurs. Cet exemple montre que les étapes de marquage et clivage peuvent être dissociées pour améliorer le marquage en fonction de la cible utilisée.

**Exemple 36 : Marquage et fragmentation d'amplicons ADN dans différents formats de réaction :**

5

Les amplicons d'ADN ont été préparés par amplification PCR selon le protocole décrit dans l'exemple 5.1. Trois réactions de marquage ont été réalisées.

**a. Marquage et fragmentation dans un format de 250 µL :**

10

A 50 µL de PCR sont ajoutés 75 µL de *méta*-BioPMDAM (100 mM dans du DMSO) et 102,5 µL d'eau Dnase/Rnase free. La solution est incubée 25 min à 95°C. Puis 22,5 µL d'HCl à 0,1 M sont ajoutés et la solution est incubée 5 min à 95°C.

15 **b. Marquage et fragmentation dans un format de 200 µL :**

A 50 µL de PCR sont ajoutés 75 µL de *méta*-BioPMDAM (100 mM dans du DMSO) et 52,5 µL d'eau Dnase/Rnase free. La solution est incubée 25 min à 95°C. Puis 22,5 µL d'HCl à 0,1 M sont ajoutés et la solution est incubée 5 min à 95°C.

20

**c. Marquage et fragmentation dans un format de 150 µL :**

A 50 µL de PCR sont ajoutés 75 µL de *méta*-BioPMDAM (100 mM dans du DMSO) et 2,5 µL d'eau Dnase/Rnase free. La solution est incubée 25 min à 95°C.

25 Puis 22,5 µL d'HCl 0,1M sont ajoutés et la solution est incubée 5 min à 95°C.

Le reste du protocole est identique à celui de l'exemple 17.



Résultats :

Protocole utilisé	Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
<i>a. Format de 250 <math>\mu</math>L</i>	100,0	5606	549	10,2
<i>b. Format de 200 <math>\mu</math>L</i>	99,4	5886	557	10,6
<i>c. Format de 150 <math>\mu</math>L</i>	99,4	6800	537	12,7

Tableau 26 : Marquage et fragmentation selon différents formats

5

Les résultats obtenus en terme de signal et de pourcentage d'homologie sont très satisfaisants dans tous les cas de figures. De plus, bien que le format de la réaction varie de 150 à 250  $\mu$ L, les résultats ont des valeurs similaires.

Cet exemple montre une flexibilité du format réactionnel du protocole de marquage pouvant  
10 accepter différents volumes et notamment différents volumes de produits d'amplification.

**Exemple 37 : Comparaison entre un protocole utilisant une étape de purification avant fragmentation et un protocole utilisant une étape de purification après fragmentation :**

15

Les amplicons d'ADN ont été préparés par amplification PCR selon le protocole décrit dans l'exemple 5.1. Deux réactions de marquage ont été réalisées.

**a. Marquage purification puis fragmentation des amplicons ADN :**

20

A 10  $\mu$ L de PCR sont ajoutés 10  $\mu$ L de *méta*-BioPMDAM (100 mM dans du DMSO) et 80  $\mu$ L d'eau Dnase/Rnase free. La solution est incubée 10 min à 95°C. Puis la purification est réalisée selon le protocole décrit dans l'exemple 17. A la solution d'amplicons marqués purifiés 6  $\mu$ L d'HCl à 0,1 M sont ajoutés. La solution est incubée 10 min à 95°C. Quatre cents  
25 (400)  $\mu$ L de tampon d'hybridation préchauffé à 95°C durant 10 min sont ajoutés.

La composition du tampon d'hybridation ainsi que le reste du protocole sont identiques à celui de l'exemple 17.

**b. Marquage fragmentation puis purification des amplicons ADN :**

A 10  $\mu$ L de PCR sont ajoutés 10  $\mu$ L de *mé*ta-BioPMDAM (100 mM dans du DMSO) et 77  $\mu$ L d'eau Dnase/Rnase free. La solution est incubée 10 min à 95°C.

Puis 3  $\mu$ L d'HCl à 0,1 M sont ajoutés et la solution est incubée de nouveau 10 min à 95°C. Le reste du protocole est identique à celui de l'exemple 17.

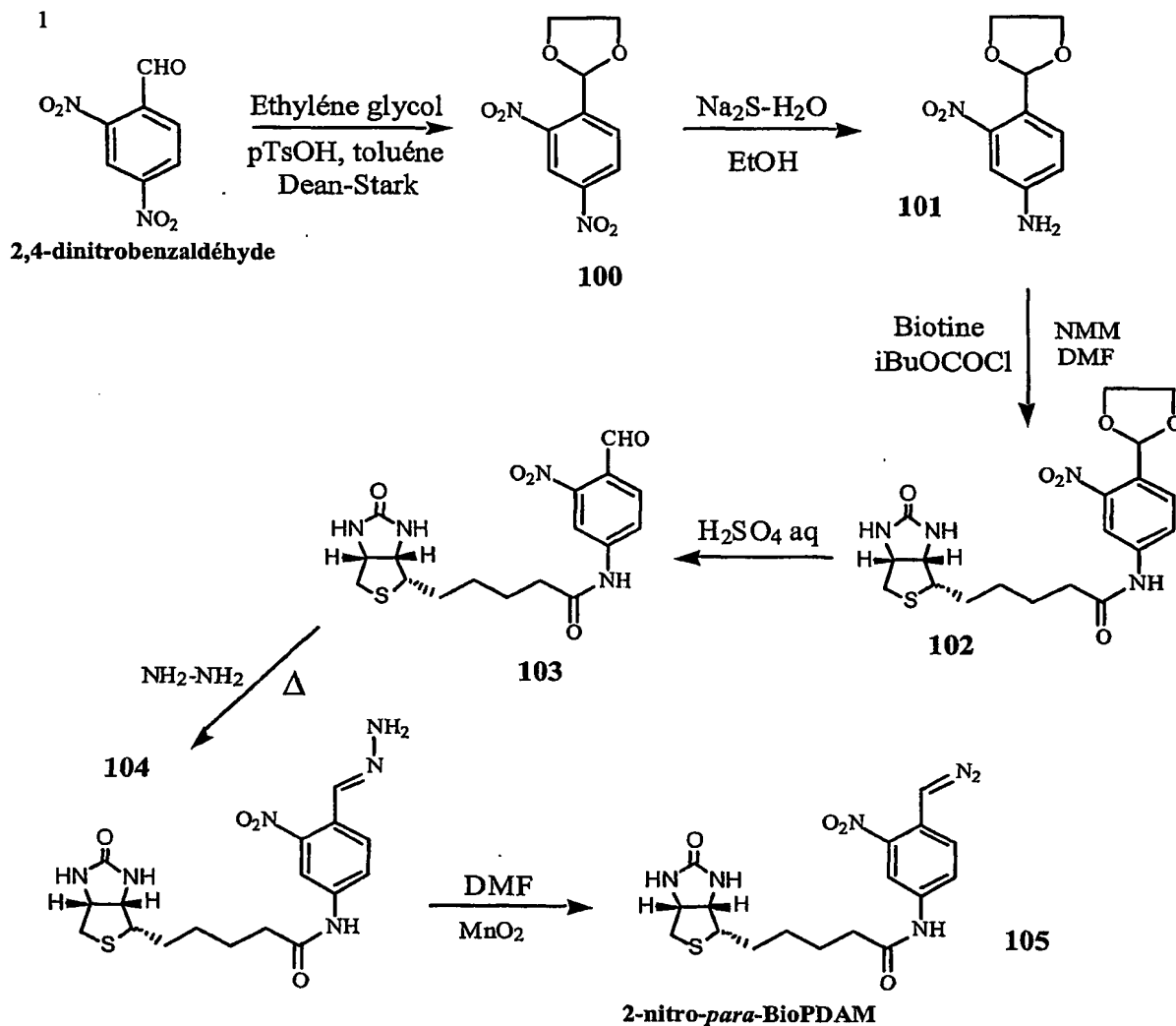
**Résultats :**

Protocole utilisé	Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
a. Purification avant fragmentation	98,9	6256	473	13
b. Fragmentation avant purification	96,1	6066	556	11

**Tableau 27 :** Comparaison entre protocole utilisant une étape de purification avant fragmentation et protocole utilisant une étape de purification après fragmentation.

Ce résultat, présenté dans le tableau 27, montre que l'étape de purification peut être introduite entre les étapes de marquage et de fragmentation. De plus l'introduction de la purification entre les étapes de marquage et de fragmentation permet de réaliser la dénaturation pendant le clivage et d'hybrider sur la puce la totalité des fragments d'amplicons marqués.

**Exemple 38 : Synthèse du 2-nitro-*para*-BioPDAM :**

Schéma de synthèse :5 ● Protection de l'aldéhyde :

On dissout 5 g (25,5 mmol) de 2,4-dinitrobenzaldehyde dans 250 mL de toluène, et l'on ajoute 20 mL d'éthylène glycol et 150 mg d'acide *para*-toluènesulfonique. On chauffe à reflux en récupérant l'eau dans un système Dean-Stark pendant 6 h. On traite avec 150 mL d'EtOAc et 100 mL d'H<sub>2</sub>O. On extrait deux fois la solution à l'acétate d'éthyle, on sèche la phase organique avec MgSO<sub>4</sub> puis on l'évapore. L'huile obtenue correspondant au produit 100, est utilisée pour la réaction suivante.

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 8,70 (d,  $1\text{H}_{\text{aro}}$ ,  $J$  = 2 Hz,  $\text{H}_3$ ) ; 8,44 (dd,  $1\text{H}_{\text{aro}}$ ,  $J$  = 2 Hz,  $J$  = 6 Hz,  $\text{H}_5$ ) ; 8,02 (d,  $1\text{H}_{\text{aro}}$ ,  $J$  = 8 Hz,  $\text{H}_6$ ) ; 6,49 (s, 1H, CH) ; 4,12-4,06 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ).

5     ● Réduction du dérivé dinitro 100 :

Le 2-4-dinitrobenzaldéhyde protégé (6,4 g ; 25,5 mmol) est dissous dans un mélange éthanol-eau (6/1), puis 2 équivalents de  $\text{Na}_2\text{S}$  nonahydraté (12,3 g ; 51,1 mmol) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est ensuite chauffé pendant 30 min. Une évaporation puis une extraction  
10 au dichlorométhane sont réalisées. Après séchage et filtration, le milieu réactionnel est évaporé afin d'obtenir une huile, qui est directement purifiée sur colonne de silice (cyclohexane-acétate d'éthyle 60/40). Le composé 101 est isolé avec un rendement de 45 %.

Composé 101 : F 58-60°C. - RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 7,49 (d,  $1\text{H}_{\text{aro}}$ ,  $J$  = 2 Hz,  $\text{H}_3$ ) ; 7,09  
15 (d,  $1\text{H}_{\text{aro}}$ ,  $J$  = 2 Hz,  $\text{H}_6$ ) ; 6,80 (dd,  $1\text{H}_{\text{aro}}$ ,  $J$  = 2 Hz,  $J$  = 6 Hz,  $\text{H}_5$ ) ; 6,27 (s, 1H, CH) ; 3,99-3,97 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ).

● Couplage avec la biotine :

20 On solubilise la D-biotine (1,0 g ; 4,1 mmol) dans 20 mL de DMF anhydre et 600  $\mu\text{L}$  de N-méthylmorpholine. On ajoute sous argon le chloroformiate d'isobutyle (700  $\mu\text{L}$  ; 5,5 mmol) en refroidissant dans un bain glacé. On laisse sous agitation pendant 5 min, puis on ajoute 1 g (4,75 mmol) du composé 101 et 500  $\mu\text{L}$  de N-méthylmorpholine. La solution est maintenue sous agitation à température ambiante pendant 4 h, puis évaporée à sec. L'huile obtenue est  
25 passée directement sur colonne de silice avec comme solvant d'élution MeOH-DCM 7 % puis 10 %. Le produit 102 (1,1 g ; 2,52 mmol) est obtenu avec un rendement de 62 %.

RMN  $^1\text{H}$  (200MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  = 10,40 (s, 1H, NH-CO) ; 8,31 (d,  $1\text{H}_{\text{aro}}$ ,  $J$  = 2 Hz,  $\text{H}_3$ ) ; 7,77 (dd,  $1\text{H}_{\text{aro}}$ ,  $J$  = 2 Hz,  $J$  = 6 Hz,  $\text{H}_5$ ) ; 7,68 (d,  $1\text{H}_{\text{aro}}$ ,  $J$  = 2 Hz,  $\text{H}_6$ ) ; 6,43 (s large, 1H, NH-CO-NH) ; 6,36 (s large, 1H, NH-CO-NH) ; 6,23 (s, 1H, CH) ; 4,28 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{-CH-NH}$ ) ; 4,14  
30 (m, 1H, CH-CH-NH) ; 3,92 (s, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ) ; 3,12 (m, 1H, CH-S) ; 2,85 et 2,76 (système

ABX, 2H,  $^2J_{AB} = 5$  Hz,  $^3J_{AX} = 12$  Hz,  $^3J_{BX} = 0$  Hz, CH<sub>2</sub>-S) ; 2,29 (t, 2H,  $J = 8$  Hz, CH<sub>2</sub>-CO) ; 1,61-1,39 (m, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>).

● Déprotection de l'acétal :

5

On met le produit **102** (768 mg ; 1,76 mmol) en suspension dans 25 mL de THF. Tout se dissout après ajout de 4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. On laisse sous agitation pendant 2 h. On évapore puis on rince et lave à l'eau sur fritté. Le composé **103** (694 mg) est obtenu sous forme d'une poudre jaune avec un rendement de 90 %.

10

F 165°C. - RMN <sup>1</sup>H (200MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 10,69 (s, 1H, NH-CO) ; 10,09 (s, H, CHO) ; 8,43 (d, 1H<sub>aro</sub>,  $J = 2$  Hz, H<sub>3</sub>) ; 7,91 (s, 2H<sub>aro</sub>, H<sub>5</sub> et H<sub>6</sub>) ; 6,42 (s large, 1H, NH-CO-NH) ; 6,35 (s large, 1H, NH-CO-NH) ;  $\delta = 6,23$  (s, 1H, CH) ; 4,29 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH-NH) ; 4,13 (m, 1H, CH-CH-NH) ; 3,12 (m, 1H, CH-S) ; 2,84 et 2,78 (système ABX, 2H,  $^2J_{AB} = 5$  Hz,  $^3J_{AX} = 12$  Hz,  $^3J_{BX} = 0$  Hz, CH<sub>2</sub>-S) ; 2,29 (t, 2H,  $J = 8$  Hz, CH<sub>2</sub>-CO) ; 1,61-1,39 (m, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>).

15

● Formation de l'hydrazone **104** :

On met l'aldéhyde **103** en suspension dans l'éthanol et l'on chauffe à 80°C. Quand on ajoute l'hydrazine, tout se dissout et la solution se colore immédiatement en orange. Un précipité se forme après 5 min. On chauffe sous agitation pendant 1 h. On filtre sur fritté puis on sèche le précipité. Le produit **104** (700 mg ; 690 mmol) est obtenu avec un rendement de 98 %.

20

F 169°C. - RMN <sup>1</sup>H (200MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 10,31 (s, 1H, NH-CO) ; 8,31 (d, 1H<sub>aro</sub>,  $J = 2$  Hz, H<sub>3</sub>) ; 7,96 (s, H, CHO) ; 7,87 (d, 1H<sub>aro</sub>,  $J = 2$  Hz, H<sub>6</sub>) ; 7,68 (dd, 1H<sub>aro</sub>,  $J = 2$  Hz,  $J = 6$  Hz, H<sub>5</sub>) ; 7,31 (s, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 6,42 (s large, 1H, NH-CO-NH) ; 6,34 (s large, 1H, NH-CO-NH) ; 4,29 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH-NH) ; 4,13 (m, 1H, CH-CH-NH) ; 3,12 (m, 1H, CH-S) ; 2,84 et 2,78 (système ABX, 2H,  $^2J_{AB} = 5$  Hz,  $^3J_{AX} = 12$  Hz,  $^3J_{BX} = 0$  Hz, CH<sub>2</sub>-S) ; 2,29 (t, 2H,  $J = 8$  Hz, CH<sub>2</sub>-CO) ; 1,61-1,39 (m, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>).

25

30

● Formation du diazo 105 :

On dissout le composé 104 (200 mg ; 0,492 mmol) dans 8 mL de DMF. On ajoute 400 mg de MnO<sub>2</sub>. On agite vigoureusement pendant 10 min. On filtre sur millipore contenant de la célite  
5 (épaisseur : 2 cm) et du tamis moléculaire en poudre 3 Å (0,5 cm). On évapore à sec puis on lave à l'éther. On filtre de nouveau sur millipore. Le composé 105 (180 mg ; 0,445 mmol) est obtenu sous forme d'une poudre orange avec un rendement de 98 %.

F 155°C. - RMN <sup>1</sup>H (200MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 10,21 (s, 1H, NH-CO) ; 8,60 (d, 1H<sub>aro</sub>, J = 2  
10 Hz, H<sub>3</sub>) ; 7,77 (d, 1H<sub>aro</sub>, J = 6 Hz, H<sub>5</sub>) ; 7,22 (d, 1H<sub>aro</sub>, J = 6 Hz, H<sub>6</sub>) ; 6,60 (s, H, CH-N) ; 6,41 (s large, 1H, NH-CO-NH) ; 6,33 (s large, 1H, NH-CO-NH) ; 4,29 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH-NH) ; 4,13 (m, 1H, CH-CH-NH) ; 3,12 (m, 1H, CH-S) ; 2,84 et 2,78 (système ABX, 2H, <sup>2</sup>J<sub>AB</sub> = 5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>AX</sub> = 12 Hz, <sup>3</sup>J<sub>BX</sub> = 0 Hz, CH<sub>2</sub>-S) ; 2,29 (t, 2H, J = 8 Hz, CH<sub>2</sub>-CO) ; 1,61-1,39 (m, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>).

15

La réactivité du composé 105 a été testée sur 3'-Uridine-monophosphate suivie par électrophorèse capillaire. Les conditions d'analyse sont celles de l'exemple 6.1. Les résultats montrent un temps de demi réaction de 45 minutes.

La stabilité du réactif est supérieure à 1 mois à -20°C

20

Exemple 39 : Marquage d'ARN par le dérivé 2-nitro-para-BioPDAM :

Le dérivé 2-nitro-para-BioPDAM 105 a été préparé selon le protocole décrit dans l'exemple 38. Les ARN transcrits ont été obtenus selon le protocole décrit dans l'exemple 5.2. Le  
25 procédé de marquage et fragmentation est effectué en une étape avec le réactif 2-nitro-para-BioPDAM dans les conditions décrites dans le tableau 28 ci-dessous. Deux réactions de marquage ont été réalisées :

a. Marquage par le dérivé 2-nitro-*para*-BioPDAM :

A 10  $\mu$ L de transcrits sont ajoutés 2  $\mu$ L de 2-nitro-*para*-bioPDAM (100 mM dans du DMSO), 3  $\mu$ L d'imidazole (1M dans l'eau), 5  $\mu$ L de  $MnCl_2$  et 85  $\mu$ L d'eau Dnase/Rnase free.

5 Cette solution est incubée 10 min à 60°C.

Le reste du protocole est identique à celui de l'exemple 8.

b. Marquage par le réactif *méta*-BioPMDAM :

10 A 10  $\mu$ L de transcrits sont ajoutés 2  $\mu$ L de *méta*-BioPMDAM (100 mM dans du DMSO), 3  $\mu$ L d'imidazole (1 M dans l'eau), 5  $\mu$ L de  $MnCl_2$  et 85  $\mu$ L d'eau Dnase/Rnase free. Cette solution est incubée 10 min à 60°C.

Le reste du protocole est identique à celui de l'exemple 8.

15 Résultats :

Protocole utilisé	Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
30 mM Im pH 9,5 ; 5 mM $MnCl_2$ 2 mM 2-nitro- <i>para</i> -BioPDAM 5 min à 60°C	98,9	14911	656	22,7
30 mM Im pH 9,5 ; 5 mM $MnCl_2$ 2 mM <i>méta</i> -BioPMDAM 10 min à 60°C	98,4	13611	694	19,6

Tableau 28 : Etude comparative du marquage d'ARN par le dérivé 2-nitro-*para*-BioPDAM vis-à-vis du dérivé *méta*-BioPMDAM

20

On voit bien dans le tableau 28 que le dérivé 2-nitro-*para*-BioPDAM donne de bons résultats de marquage sur les ARN. Des substitutions telles que le groupement nitro peuvent être utilisées pour moduler la réactivité et la stabilité des marqueurs portant la fonction diazométhyle.

**Exemple 40 : Marquage et fragmentation des amplicons d'ADN avec le réactif de marquage 2-nitro-*para*-BioPDAM :**

5

Le dérivé 2-nitro-*para*-BioPDAM a été obtenu selon le schéma réactionnel décrit dans l'exemple 38. Les amplicons ADN ont été préparés par amplification PCR selon le protocole décrit dans l'exemple 5.1. Deux réactions de marquage ont été réalisées.

10 **a. Marquage par le réactif 2-nitro-*para*-BioPDAM :**

A 10 µL de PCR sont ajoutés 2 µL de 2-nitro-*para*-BioPDAM (100 mM dans du DMSO), 5µL d'HCl à 0,1 M et 83 µL d'eau Dnase/Rnase free. Cette solution est incubée 30 min à 60°C.

15

**b. Marquage par le réactif *méta*-bioPMDAM :**

A 10 µL de PCR sont ajoutés 2 µL de *méta*-BioPMDAM (100 mM dans du DMSO), 5µL d'HCl à 0,1 M et 83 µL d'eau Dnase/Rnase free. Cette solution est incubée 30 min à 60°C.

20

Le reste du protocole est identique à celui de l'exemple 17.



Résultat :

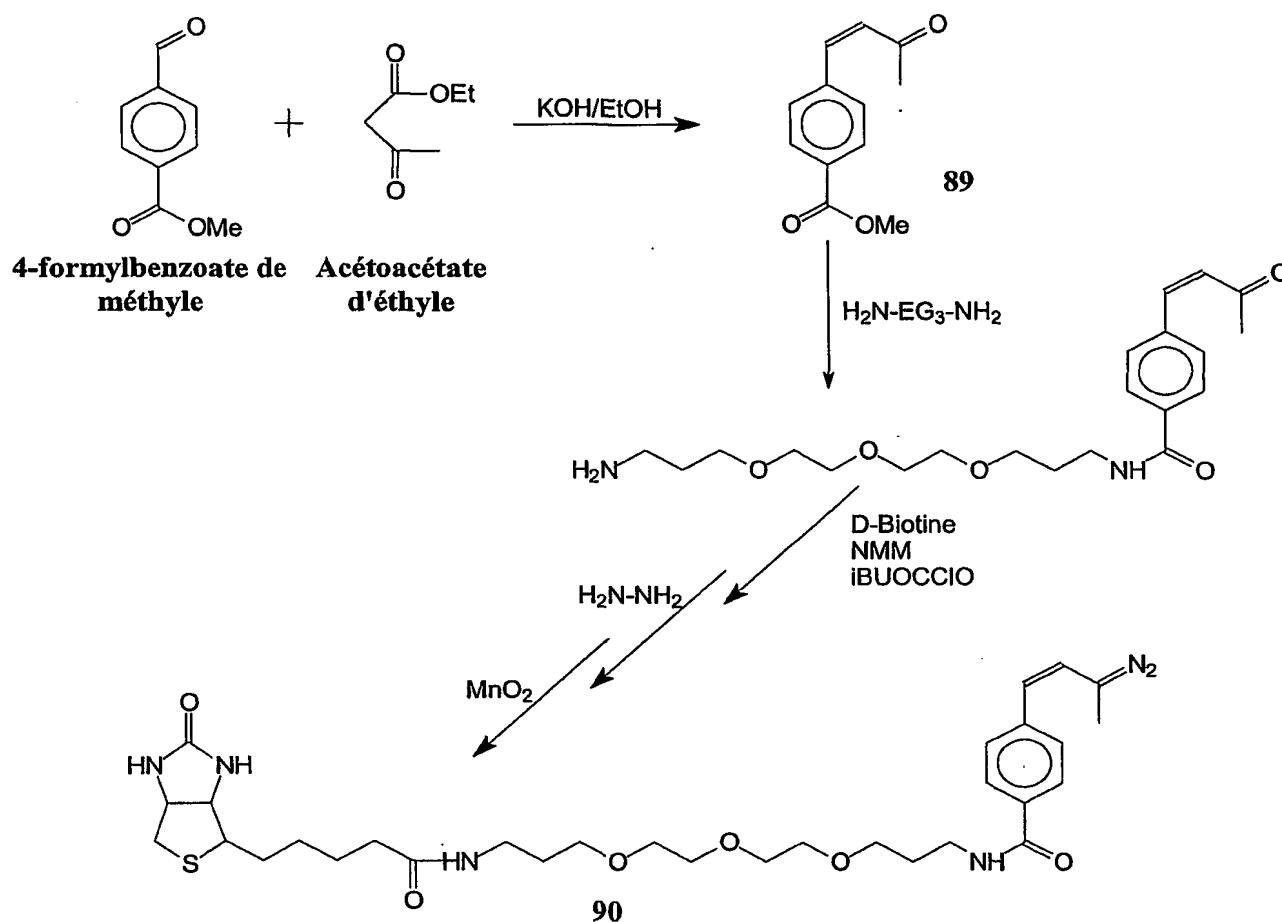
Protocole utilisé	Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
<i>a. Marquage par le réactif 2-nitro-para-BioPDAM</i>	100,0	24392	899	27,1
<i>b. Marquage par le réactif méta-BioPMDAM</i>	98,9	21883	774	28,3

**Tableau 29 :** Etude comparative du marquage d'ADN par le dérivé 2-nitro-*para*-BioPDAM vis-à-vis du dérivé *méta*-BioPMDAM

Le réactif 2-nitro-*para*-BioPDAM utilisé pour le marquage de l'ADN donne des résultats intéressants en terme d'intensité de marquage et de pourcentage d'homologie.

**Exemple 41 : Insertion d'une double liaison entre la fonction diazométhyle et le noyau phényle, éloignement du DAM et synthèse d'une molécule particulièrement adaptée à cet éloignement :**

- 15 L'objectif visé est l'éloignement de la fonction diazométhyle (DAM) de la structure aromatique pour minimiser l'effet de l'encombrement stérique lors de l'alkylation des phosphates et aussi lors de l'hybridation de l'acide nucléique marqué avec sa séquence complémentaire.

Schéma de synthèse :

5

Pour la réaction aldolique de formation du (*para*-méthoxycarbonyl)-styrylméthylcétone **89**, on utilise l'acétoacétate d'éthyle pour la forte acidité des protons du méthylène, ce qui facilite l'attaque du groupement formyl, avec élimination postérieure de  $\text{H}_2\text{O}$  (favorisée par la conjugaison de la double liaison avec l'anneau aromatique) et décarboxylation par hydrolyse

10 autres exemples. Le reste de la synthèse est similaire à ce qui a été montré dans les

Le produit final *para*-Bio-EG<sub>3</sub>-SMDAM **90**, possède deux carbones de plus entre le diazométhyle et l'anneau aromatique, ce qui limite les possibles problèmes stériques, tout en conservant la stabilisation du diazométhyle par le système aromatique par conjugaison.

15

**Exemple 42 : Capture et détection d'un acide nucléique sur un support solide comprenant des groupements diazométhyles :**

- 5 La réactivité d'une résine portant des groupements diazométhyle a été étudiée pour déterminer sa capacité à lier des acides nucléiques.

La 4-(Diazomethyl)phenoxyethyl-polystyrene (référence 17338, Fluka) est une résine décrite pour son pouvoir à lier les groupements carboxyliques, en particuliers ceux présents dans les  
10 protéines (G. Bhalay, A.R. Dunstan, Tetrahedron Lett. 39, 7803 – 1998), mais elle n'est pas décrite pour sa capacité à lier les molécules d'ADN. Nous avons testé la possibilité de capturer des acides nucléiques avec ce réactif, et de les révéler par un test colorimétrique.

L'expérience est réalisée avec une partie des réactifs présents dans le kit HLA-DR oligo-  
15 détection (référence 33 202, bioMérieux, France principe de base décrit dans le brevet EP 549 776-B1), permettant la détection d'acides nucléiques amplifiés par PCR dans des microplaques, par lecture colorimétrique. Dans le cadre de l'expérience décrite, on fait réagir simultanément des acides nucléiques produits par PCR avec la résine testée, ainsi qu'avec une molécule de *para*-Bio-EG3-PDAM, dont la synthèse est évoquée dans  
20 l'exemple 28. Si l'ADN réagit avec les fonctions diazométhyle présentes sur les deux composés, il sera possible de le révéler, après lavage et élimination des molécules fixées de manière non covalente, grâce à une réaction colorimétrique faisant intervenir une enzyme couplée à la streptavidine. La streptavidine est associée à une peroxydase de raifort, cet enzyme pouvant décomposer une molécule d'OrthoPhénylène Diamine (réactif Color 1 du  
25 kit) en un composé détectable à une longueur d'onde de 492 nm.

**Exemple 42.1 : Capture et détection de l'ADN :**

On incube 10 mg de résine pendant 30 minutes à 60°C avec 50 µL de PCR réalisées comme  
30 décrit dans l'exemple 5.1, dans 400 µL d'eau pure (Sigma) additionnée de 5 µL de *para*-Bio-EG3-PDAM. On lave ensuite cette résine par 500 µL de tampon PBS tween (Réactif Color 0

HLA du kit, PBS pH 7,0 ; Tween 1 %, BND 0,2 g/L ; Ciproflaxacine 0,01 g/L). On remet en suspension alors la résine dans 100 µL de PBS Tween, et 250 µL de tampon d'hybridation streptavidine (PBS pH 7,0 ; TWEEN 0,5 %) additionné de streptavidine HRP (S-911, MOLECULAR PROBES, EUGENE, OR, USA) dilué au 1/10000. On incube le mélange  
5 réactionnel 30 min à température ambiante. On lave ensuite la résine trois (3) fois par 500 µL de tampon PBS tween, et on l'incube à température ambiante en présence de réactif chromogénique (1 Comprimé Color 1, Chlorhydrate d'orthophénylène diamine, dilué dans 5 mL de tampon Color 2, Phosphate de sodium 100 mM, acide citrique 50 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% ). Après une incubation de 20 min à l'obscurité, la réaction est ensuite bloquée par 50 µL de  
10 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1, 8 N réactif Color 3). Le surnageant est alors pipeté et placé dans une microplaque pour lire l'absorbance du milieu réactionnel à 492 nm.

**Exemple 42.2 : Témoin sans acide nucléique :**

15 On incube 10 mg de résine pendant 30 minutes à 60°C dans 425 µL d'eau pure (Sigma) additionnée de 5 µL de *para*-Bio-EG3-PDAM. On lave ensuite cette résine par 500 µL de tampon PBS. On traite alors l'échantillon de façon identique à processus décrit à l'exemple 42.1.

20 **Exemple 42.3 : Témoin avec PCR réalisée sans cibles :**

On incube 10 mg de résine dans 400 µL d'eau pure additionnée de 5 µL de *para*-Bio-EG3-PDAM pendant 30 minutes à 60°C, avec 50 µL de PCR réalisée avec un volume de 25 µL d'eau pure à la place du volume l'ADN génomique décrit. On lave ensuite cette résine par 500  
25 µL de tampon PBS. On traite alors l'échantillon de façon identique au processus décrit à l'exemple 42.1.

**Exemple 42.4 : Témoin avec PCR sans molécule de révélation :**

30 On incube 10 mg de résine avec 50 µL de PCR dans 400 µL d'eau pure pendant 30 minutes à 60°C. On lave ensuite cette résine par 500 µL de tampon PBS. On traite alors l'échantillon de façon identique au processus décrit à l'exemple 42.1.

**Exemple 42.5 : Témoin avec acide nucléique non capturé :**

On incube 10 mg de résine pendant 30 minutes à 60°C avec 400 µL d'eau pure additionnée de  
 5 5 µL de *para*-Bio-EG3-PDAM. On lave ensuite cette résine par 500 µL de tampon PBS tween  
 (Réactif Color 0 HLA du kit, PBS pH 7,0 ; Tween 1 %, BND 0,2 g/L ; Ciproflaxacine 0,01  
 g/L). On resuspend alors la résine dans 100 µL de PBS Tween, et 250 µL de tampon  
 d'hybridation streptavidine additionné de streptavidine HRP dilué au 1/10000 ème. A cette  
 préparation est rajoutée 50µL d'une préparation d'ADN préparée comme suit :

On rajoute 5 µL de *para*-Bio-EG3-PDAM et 70 µL d'eau pure à 25 µL d'ADN provenant  
 d'une PCR préparé comme décrit dans l'exemple 5.1. Ce mélange est incubé 30 min à 60°C,  
 puis l'excès de marqueur est éliminé en soumettant la préparation à une purification sur  
 colonne QIAquick (Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden, Allemagne) suivant le protocole  
 15 recommandé par le fournisseur, en effectuant une élution finale dans un volume de 50 µL.

Le mélange réactionnel est incubé 30 min à température ambiante, puis il est traité suivant le  
 processus décrit à l'exemple 42.1.

**Résultats**

Conditions	Absorbance à 492 nm
Ex. 42.1 : ADN capturé sur Résine	527
Ex. 42.2 : Sans acide nucléique	249
Ex. 42.3 : PCR sans cible	261
Ex. 42.4 : Témoin sans marqueur	264
Ex. 42.5 : Acide nucléique non capturé	249

**Tableau 30 :** Etude de la réactivité d'une résine portant des groupements diazométhyle

Dans le tableau 30, une forte valeur colorimétrique indique une forte concentration d'enzymes dans le milieu réactionnel, correspondant à une présence importante d'acide nucléique portant des dérivés biotines. Les témoins indiquent que le signal n'est pas dû à une adsorption non spécifique de l'ADN sur la bille, à une réaction du *para*-Bio-EG3-PDAM sur la résine, ou à une adsorption de la streptavidine HRP sur la résine, mais bien à la présence d'ADN capturé de façon covalente et marqué par le *para*-Bio-EG3-PDAM.

**Exemple 43 : Marquage d'un produit PCR permettant sa capture et sa détection dans une microplaque :**

Il est montré dans cet exemple la possibilité de marquer une molécule d'ADN avec un seul type de molécule portant une fonction diazométhyle, de façon à capturer et à détecter cet acide nucléique en une seule étape, sur une microplaque.

L'expérience est réalisée avec une partie des réactifs présent dans le kit HLA-DR oligo-détection (référence 33 202, bioMérieux), permettant la détection d'acides nucléiques amplifiés par PCR dans des microplaques, par lecture colorimétrique. Dans le cadre de l'expérience décrite, on fait réagir du *para*-Bio-EG3-PDAM, dont la synthèse est décrite dans l'exemple 28, sur des acides nucléiques produits par PCR. L'ADN réagit avec les groupements diazométhyle de la molécule, et se trouve ainsi doté de biotines greffé sur ses phosphate. Il sera alors possible de capturer l'acide nucléique par incubation sur une microplaque où des molécule de streptavidine sont adsorbées, et de le révéler, grâce à une réaction colorimétrique. On utilise un réactif de détection qui est aussi une molécule de streptavidine, associée à une peroxydase de raifort (Horse Radish Peroxidase, HRP). Dans les condition utilisées, la peroxydase peut décomposer une molécule d'OrthoPhénylène Diamine (réactif Color 1 du kit) en un composé détectable à une longueur d'onde de 492 nm.

**Exemple 43.1 : Capture et détection de l'ADN issu de PCR, sur microplaque :**

On marque 10 µL d'ADN obtenu par amplification PCR comme décrit dans l'exemple 5.1 en l'incubant 30 min à 60°C dans 80 µL d'eau pure (Sigma) additionnée de 10 µL de *para*-Bio-EG3-PDAM. Après marquage, l'ADN est purifié sur colonne QIAquick (Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden, Allemagne) suivant le protocole recommandé par le fournisseur, et l'éluat final est recueilli dans 50 µL de tampon EB (Tris EDTA 10 mM, pH 8,5). Vingt (20) µL de cet éluat est dilué dans 180 µL de tampon PEG (0,1 M Na PO<sub>3</sub> ; 0,5 M NaCl ; 0,65% Tween 20 ; 0,14 mg/mL ADN de sperme de Saumon (Gibco) ; 2 % PEG 4000) additionné de streptavidine HRP (S-911, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) diluée au 1/10 000. Cent (100) µL de cette préparation sont ensuite incubés 1 heure à 37°C, soit dans un puits de Combiplate 8, streptavidine coated, (référence 95029263, Labssystem, Helsinki, Finlande) soit dans un puits témoin, provenant d'une barrette Maxisorb. (Nunc, Danemark).

15

**Exemple 43.2 : Réalisation de témoins :**

Des témoins sont simultanément réalisés de la manière suivante :

**20    A - Témoin de marquage sans ADN :**

Quatre-vingt-dix (90) µL d'eau pure additionnés de 10 µL de *para*-Bio-EG3-PDAM sont incubés 30 min à 60°C. Le mélange réactionnel est ensuite traité de façon similaire au processus précédemment décrit à l'exemple 43.1.

**25    B - Témoin de marquage sans marqueurs :**

Dix (10) µL d'ADN obtenus par amplification PCR, comme décrit dans l'exemple 5.1, sont incubés 30 min à 60°C dans 90 µL d'eau pure. Le mélange réactionnel est ensuite traité de façon similaire au processus précédemment décrit à l'exemple 43.1.

30    Toutes les barrettes sont ensuite lavées par trois fois 100 µl de tampon PBS Tween (Réactif Color 0 HLA du kit, PBS pH 7,0 ; Tween 1 %, BND 0,2 g/L ; Ciproflaxacine 0,01

g/L) puis la présence de streptavidine HRP est révélée par addition de 100  $\mu$ L du réactif chromogénique (1 Comprimé Color 1, Chlorhydrate d'orthophénylène diamine, dilué dans 5 mL de tampon Color 2, Phosphate de sodium 100 mM, acide citrique 50 mM,  $H_2O_2$  0,03%), incubé 20 min dans l'obscurité, la réaction étant ensuite bloquée par 50  $\mu$ L de  $H_2SO_4$  (1,8 N Réactif Color3). L'absorbance du milieu réactionnel est alors mesurée à 492 nm.

#### Résultats :

Conditions	Combiplate	Témoin maxisorp
A - ADN marqué	1382	152
B - ADN non marqué	178	136
C - Sans ADN	140	192

Tableau 31 : Détection d'ADN capturé et marqué par du *para*-Bio-EG3-PDAM

L'expérience, exposée dans le tableau 31, montre donc que l'ADN marqué par du *para*-Bio-EG3-PDAM peut être capturé et détecté en une seule étape dans un puits de microplaque. Comme l'indique les témoins de réaction, le signal généré est uniquement dû à l'ADN et ne résulte pas d'une adsorption non spécifique de l'acide nucléique sur la paroi de la microplaque, ou sur la streptavidine, ou bien à une réaction non spécifique de la streptavidine HRP sur l'ADN non marqué, ou sur le plastique de la microplaque.

#### Exemple 44 : Double marquage d'un produit PCR permettant sa capture et sa détection sur un support solide de type microplaque :

Il est montré dans cet exemple la possibilité de marquer avec deux molécules, porteuses de fonctions diazométhyles, et en une seule étape, une molécule d'ADN, de façon la capturer et à la détecter sur une microplaque.



L'expérience est réalisée avec une partie des réactifs présent dans le kit HLA-DR oligo-détection, permettant la détection d'acides nucléiques amplifié par PCR dans des microplaques, par simple lecture colorimétrique. Dans le cadre de l'expérience décrite, on fait réagir simultanément sur des acides nucléiques produits par PCR du :

- 5 • 1-Pyrényldiazométhane (PDAM), et
- *para*-Bio-EG3-PDAM.

Si l'ADN réagit avec les fonctions diazométhyle présentes sur les deux composés, il pourra se fixer sur un support portant des anticorps anti-pyrène, et il sera possible de le révéler avec une molécule de streptavidine associée à une peroxydase de raifort. Cette enzyme  
10 peut décomposer une molécule d'OrthoPhénylène Diamine, faisant office de réactif de révélation, en un composé détectable à une longueur d'onde de 492 nm.

**Exemple 44.1 : Double marquage de l'ADN et détection sur microplaque :**

15 On a adsorbé sur des barrettes Maxisorp huit (8) puits, des anticorps anti-pyrène, en incubant une nuit à température ambiante 100 µL d'une solution de 1,1 µL d'anticorps anti-pyrène dilués dans 100 µL de tampon bicarbonate (0,05M pH 9,6). De tels anticorps, appelés Rabbit anti-pyrène (Réf. : YSRT-AHP236) sont disponibles chez Accurate Chemical & Scientific (Westbury, New York, USA). Bien entendu, ceci aurait pu être  
20 réalisé avec d'autres anticorps commercialement disponibles, sans qu'il y ait de résultats divergents par rapport à ceux que nous avons obtenus dans cet exemple.

On a ensuite marqué 10 µL d'ADN obtenu par amplification PCR, comme décrit dans l'exemple 5.1, en l'incubant 30 min à 60°C dans 40 µL d'eau pure (Sigma), 10 µL de  
25 *para*-Bio-EG3-PDAM, 2 µL de PDAM (P-1405, 1-pyrenyldiazomethane, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) et 38 µL de DMSO.

Après marquage, l'ADN a été purifié par utilisation d'un kit QIAquick (QIAGEN) et l'éluat final a été recueilli dans 50 µL de tampon EB (Tris EDTA 10 mM, pH 8,5). Vingt  
(20) µL de cet éluat a été dilué dans 180 µL de tampon PEG (0,1 M Na PO<sub>3</sub> ; 0,5 M  
30 NaCl ; 0,65 % Tween 20 ; 0,14 mg/mL ADN de sperme de Saumon (Gibco) ; 2 % PEG 4000) additionné de streptavidine HRP (S-911, MOLECULAR PROBES, EUGENE, OR,

USA) diluée au 1/10 000. Cent (100)  $\mu$ L de cette préparation ont été ensuite incubés 1 heure à 37°C, soit dans un puits de barrette Maxisorp adsorbé, soit dans un puits témoin, non adsorbé.

5 **Exemple 44.2 : Réalisation de témoins :**

Des témoins ont été simultanément réalisés de la manière suivante :

A - Témoin de marquage avec *para*-Bio-EG3-PDAM seul :

- 10 Dix (10)  $\mu$ L d'ADN obtenus par amplification PCR, comme décrit dans l'exemple 5.1, sont marqués par incubation de 30 min à 60°C dans 90  $\mu$ L d'eau pure additionnée de 10  $\mu$ L de *para*-Bio-EG3-PDAM. Après marquage, l'ADN est purifié par utilisation d'un kit QIAquick et l'éluat final est recueilli dans 50  $\mu$ L de tampon EB. Vingt (20)  $\mu$ L de cet éluat est dilué dans 180  $\mu$ L de tampon PEG additionné de streptavidine HRP diluée au 1/10 000.
- 15 Cent (100)  $\mu$ L de cette préparation sont ensuite incubés 1 heure à 37°C, soit dans un puits de barrette Maxisorp adsorbé, soit dans un puits non adsorbé.

B - Témoin de marquage avec PDAM :

- Dix (10)  $\mu$ L d'ADN obtenus par amplification PCR, comme décrit dans l'exemple 5.1,
- 20 sont marqués par incubation de 30 min à 60°C dans 90  $\mu$ L d'eau pure additionnée de 2  $\mu$ L de PDAM et 38  $\mu$ L de DMSO. Après marquage, l'ADN est purifié par utilisation d'un kit QIAquick et l'éluat final est recueilli dans 50  $\mu$ L de tampon EB. Vingt (20)  $\mu$ L de cet éluat est dilué dans 180  $\mu$ L de tampon PEG additionné de streptavidine HRP diluée au 1/10 000. Cent (100)  $\mu$ L de cette préparation sont ensuite incubés 1 heure à 37°C, soit dans un puits
- 25 de barrette Maxisorp adsorbé, soit dans un puits non adsorbé.

C - Témoin sans marquage :

- Dix (10)  $\mu$ L d'ADN obtenus par amplification PCR, comme décrit dans l'exemple 5.1, sont incubés 30 min à 60°C dans 100  $\mu$ L d'eau pure. Après marquage, l'ADN est purifié
- 30 par utilisation d'un kit QIAquick et l'éluat final est recueilli dans 50  $\mu$ L de tampon EB. Vingt (20)  $\mu$ L de cet éluat est dilué dans 180  $\mu$ L de tampon PEG additionné de

streptavidine HRP diluée au 1/10 000. Cent (100)  $\mu\text{L}$  de cette préparation sont ensuite incubés 1 heure à  $37^\circ\text{C}$ , soit dans un puits de barrette Maxisorp adsorbé, soit dans un puits non adsorbé.

- 5 Les barrettes sont ensuite lavées par trois fois 100  $\mu\text{L}$  de tampon PBS Tween (color 0) puis la présence de streptavidine HRP est révélée par addition de 100  $\mu\text{L}$  du réactif chromogénique (Color 2), incubé 20 min dans l'obscurité, la réaction étant ensuite bloquée par 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Color3). L'absorbance du milieu réactionnel est alors mesurée à 492 nm.

10

#### Résultats :

Conditions	Anticorps anti-pyrène adsorbés sur plaque (rfu)	Témoin plaque non adsorbée (rfu)
Ex. 44.1 : ADN marqué PDAM + <i>para</i> -Bio-EG3-PDAM	348	16
Ex. 44.2.A : ADN marqué <i>para</i> -Bio-EG3-PDAM	44	19
Ex. 44.2.B : ADN marqué PDAM	68	12
Ex. 44.2.C : ADN non marqué	75	19

Tableau 32 : Double marquage de l'ADN par le PDAM et le *para*-Bio-EG3-PDAM

15

Le résultat du tableau 32 montre clairement un signal important résultant de la capture de l'ADN dans les puits par les anticorps anti-pyrène, ainsi que le marquage simultané de celui-ci par la streptavidine HRP, qui s'est fixée. Comme le montre l'absence de signal au niveau des témoins, cette détection est spécifique de l'ADN marqué, et n'est pas dû à l'adsorption non

20 spécifique de l'ADN ou de la streptavidine HRP sur le plastique, ou à une liaison non spécifique de l'enzyme sur l'ADN capturé. Cet exemple montre donc qu'il est possible de

réaliser un double marquage de l'ADN en une seule étape, ce double marquage pouvant être utilisé pour le capturer et le détecter simultanément.

5    **Exemple 45 : Marquage d'un produit PCR permettant simultanément sa capture et sa détection par sondes nucléiques complémentaires :**

Cette expérience permet de démontrer qu'il est possible de détecter spécifiquement un ADN, ledit ADN étant capturé sur une surface solide en utilisant la réactivité de la fonction  
10    diazométhyle vis-à-vis d'un groupement phosphate de l'ADN.

L'expérience est réalisée avec une partie des réactifs présents dans le kit HLA-DR oligo-détection (référence 33 202, bioMérieux, France), permettant la détection d'acides nucléiques amplifié par PCR dans des microplaques, par lecture colorimétrique. Dans le  
15    cadre de l'expérience décrite, on fait réagir du *para*-Bio-EG3-PDAM sur des acides nucléiques produit par PCR. L'ADN réagit avec les fonctions diazométhyle de la molécule, et se trouve ainsi doté de biotines greffées sur ses phosphates. Il sera alors possible de capturer l'acide nucléique par incubation sur une microplaque où des molécule de streptavidine sont adsorbées, et de le révéler, grâce à une sonde constitué par un  
20    oligonucléotide complémentaire de la séquence capturée, associée à une peroxydase de raifort, cette enzyme pouvant décomposer des molécules incolores d'OrthoPhénylène Diamine (réactif Color 1 du kit) en un composé détectable à une longueur d'onde de 492 nm.

25    **Exemple 45.1 : Capture et détection spécifique de l'ADN sur microplaque :**

On réalise en double le marquage de 10 µL d'ADN, obtenu par amplification PCR, en l'incubant 30 min à 60°C avec 20 µL de *para*-Bio-EG3-PDAM. Après marquage, l'ADN est purifié sur colonne QIAquick (Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden, Allemagne)  
30    suivant le protocole recommandé par le fournisseur et l'éluat final est recueilli dans 50 µL de tampon EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5). Quatre-vingt-cinq (85) µL du mélange de ces

éluats sont dénaturés par 8,5 µL de réactif R4 (NaOH 2N) durant 5 min à température ambiante, puis la solution est ensuite neutralisée par 8,5 µL de réactif R5 (acide acétique 2 N). On rajoute au mélange 850 µL de tampon d'hybridation (R6 – Tris-HCL 10 mM, pH 7,0 BND 0,2 g/L, Ciproflaxacine 0,01 g/L.) et 85 µL d'oligonucléotide de détection (R7 –  
5 Phosphate de sodium 4 mM, Phosphate de potassium 1 mM, pH 7,0, Sérum albumine bovine 0,1 %, Phénol 0,5%). Cent (100) µL de cette préparation sont déposés soit sur le contrôle positif d'une barrette R1 fournie avec le kit, (hybridation avec une séquence consensus du gène amplifié), soit sur une plaque Combiplate 8 streptavidine coated (référence 95029263, Labsystem, Helsinki, Finlande), soit sur une plaque témoin Maxisorp  
10 (Nunc, Danemark).

Parallèlement, la même réaction d'hybridation est réalisée sur une dilution, dans du tampon EB, au dixième et au centième, de la préparation d'ADN, afin de tester la sensibilité de la technique.

15

#### **Exemple 45.2 : Réalisation des témoins :**

Des témoins ont été simultanément réalisés de la manière suivante :

#### **20 A - Comparaison au kit HLA-DR :**

Dix (10) µL d'ADN obtenus par amplification PCR, comme décrit à l'exemple 5.1, sont incubés 30 min à 60°C avec 20 µL de *para*-Bio-EG3-PDAM. Après marquage, l'ADN est purifié sur colonne QIAquick, et l'éluat final est recueilli dans un volume de 50 µL de  
25 tampon EB. Les 45 µL d'éluat sont dénaturés par 4,5 µL de réactif R4 durant 5 min à température ambiante, puis la solution est neutralisée par 4,5 µL de réactif R5. On rajoute au mélange 450 µL de tampon d'hybridation R6 et 45 µL d'oligonucléotide de détection. Cent (100) µL de cette préparation sont déposés soit sur le contrôle positif d'une barrette R1 fournie avec le kit (capture par une séquence consensus du gène amplifié), soit sur une  
30 plaque Combiplate 8 streptavidine, soit sur une plaque témoin Maxisorp.

**B - Hybridation réalisée sur un ADN ne s'hybridant pas à la sonde spécifique :**

Dix (10)  $\mu\text{L}$  d'ADN obtenu par amplification PCR, comme décrit dans l'exemple 5.1, sont incubés 30 min à 60°C avec 20  $\mu\text{L}$  de *para*-Bio-EG3-PDAM. On traite alors l'échantillon de façon identique à processus décrit précédemment dans l'exemple A.

**C - Témoin sans ADN :**

Dix (10)  $\mu\text{L}$  de réactif R6 (tampon d'hybridation) et 100  $\mu\text{L}$  de réactif R7 (oligonucléotide de détection) sont déposés soit sur le contrôle positif d'une barrette R1 fournie avec le kit, sur une plaque streptavidine, soit sur une plaque témoin de type Maxisorp.

Toutes les barrettes des trois essais ci-dessus sont incubées une heure et demie à 37°C, puis lavées par trois fois 100  $\mu\text{L}$  de tampon PBS Tween (réactif color 0 HLA) puis la présence de la sonde de détection spécifique est révélée par addition de 100  $\mu\text{L}$  du réactif chromogénique (Réactif Color 2, , PBS pH 7,0 ; Tween 1 %, BND 0,2 g/L ; Ciproflaxacine 0,01 g/L), incubé 20 min dans l'obscurité, la réaction étant ensuite bloquée par 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1,8 N réactif Color 3). L'absorbance du milieu réactionnel est alors mesurée à 492 nm.

**Résultats :**

Conditions	Barrette R1 Kit HLA DR (Capture spécifique)	Combiplate (Streptavidine)	Maxisorp (Témoin)
A - ADN marqué - Ex 45.1	1215	2160	16
A - ADN marqué (dilué au 1/10ème)	NA	900	NA
A - ADN marqué (dilué au 1/100ème)	NA	53	NA
B - Témoin ADN non marqué - Ex 45.2 A	1153	40	17
C- Témoin ADN bactérien - Ex 45.2 B	24	15	NA
D - Témoin sans ADN - Ex 45.2 C	13	12	17

**Tableau 33 :** Détection spécifique sur microplaque d'un ADN issus de PCR

Les résultats du tableau 33 indiquent une excellente amplification de la cible permettant d'envisager une utilisation dans un cadre diagnostique. Cet exemple montre que le marquage au niveau des groupements phosphate permet la capture de l'ADN et n'empêche par  
5 l'hybridation spécifique sur celui-ci.

**Exemple 46 : Capture et amplification d'ADN issu d'un lysat bactérien et marqué par le para-Bio-EG3-PDAM :**

10 Cet exemple montre qu'il est possible de capturer et d'amplifier un ADN bactérien en utilisant une capture basée sur la réactivité de la fonction diazométhyle sur le phosphate de l'acide nucléique.

Dans le cas présent, les acides nucléiques contenus dans un lysat bactérien et marqués par du  
15 *para*-Bio-EG3-PDAM, sont capturés sur des billes magnétiques recouvertes de streptavidine. L'utilisation de billes magnétiques permet d'immobiliser celles-ci par aimantation lors des lavages successifs visant à éliminer les résidus cellulaires, présents dans le milieu réactionnel, ces résidus devant être éliminés car ils peuvent inhiber l'amplification par PCR qui est pratiqué par la suite.

20 Les produits d'amplification ont pu être analysés par passage sur puces à ADN.

L'ADN bactérien est obtenu par lyse des cellules contenues dans une culture de *Mycobacterium tuberculosis*. La lyse s'effectue par lyse mécanique. Plus précisément, elle est réalisée par sonication, l'échantillon liquide traité contenant des billes de verre. Un tel procédé  
25 est déjà bien décrit par la Demanderesse dans sa demande de brevet WO-A-99/15621, en ce qui concerne les billes, et dans sa demande de brevet WO-A-00/60049, en ce qui concerne la sonication. La sonication peut également être réalisée à l'aide d'un bain liquide.

Toutefois d'autres techniques, connues de l'homme du métier, peuvent être utilisées comme celles décrites dans le brevet US-A-5,902,746 et les demandes de brevet WO-A-98/54306 et  
30 WO-A-00/05338. Tous ces titres de Propriété Industrielle appartiennent à la Demanderesse.

L'ADN bactérien a été quantifié par Picogreen (P-7589 ; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) suivant le protocole décrit par le fournisseur, à une concentration de  $10^7$  copies par  $\mu\text{L}$ .

5 Dix (10)  $\mu\text{L}$  de lysat sont incubés en présence de 20  $\mu\text{L}$  de *para*-Bio-EG3-PDAM durant 30 minutes à 60°C. Parallèlement, 10  $\mu\text{L}$  de lysat sont incubés dans 20  $\mu\text{L}$  d'eau pure (Sigma) dans les mêmes conditions.

10 Le milieu réactionnel est ensuite purifié sur colonne QIAquick (Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden, Allemagne). Le protocole de purification utilisé est celui recommandé par le fournisseur. Le volume final d'élution est de 50  $\mu\text{L}$ .

Les fragments d'ADN marqués sont ensuite capturés sur des billes magnétiques Dynal (Dynabeads M-280 streptavidin ; référence 112.05 ; Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway), qui sont préparées selon le protocole suivant :

15 Quatre-vingt-dix (90)  $\mu\text{L}$  de billes Dynal sont lavés deux fois par 200  $\mu\text{L}$  d'eau pure Free (Sigma), puis sont repris par 200  $\mu\text{L}$  de tampon PEG (0,1 M  $\text{Na PO}_4$ , pH 7, 0,5 M NaCl ; 0,65 % Tween 20 ; 0,14 mL ADN de sperme de Hareng (Référence 15634-017, GibcoBRL) ; 2 % PEG 4000) et incubés 30 min à 37°C. Elles sont ensuite lavées deux fois par 200  $\mu\text{L}$  de tampon PBS 1X Tween 20 0,5%, puis finalement reprises par 90  $\mu\text{L}$  du même tampon.

20

Dix (10)  $\mu\text{L}$  des éluats d'ADN marqués ou non marqués sont incubés 5 min à température ambiante avec 40  $\mu\text{L}$  de tampon PEG et 2,5  $\mu\text{L}$  de la préparation de billes magnétiques décrite précédemment.

25 Les billes sont ensuite lavées trois fois par 200  $\mu\text{L}$  de tampon PBS 1 X tween 0,5%, reprises dans 200  $\mu\text{L}$  d'eau et incubées 20 min à 60°C, puis lavées de nouveau quatre fois par 200  $\mu\text{L}$  de PBS tween. Les billes sont finalement reprises par 25  $\mu\text{L}$  d'eau et une PCR est réalisée en suivant le protocole décrit à l'exemple 5.1. Deux contrôles réactionnels sont effectués l'un avec 25  $\mu\text{L}$  d'eau pure et l'autre avec 2,5  $\mu\text{L}$  de billes préparées et lavées dans les mêmes conditions que les échantillons biologiques, et reprises dans 25  $\mu\text{L}$  d'eau.

30



Résultat :

Les produits de PCR sont ensuite quantifiés par Picogreen (P-7589 ; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) suivant le protocole décrit par le fournisseur. Cette méthode repose sur l'utilisation d'une molécule (Picogreen) ayant la particularité de devenir fluorescente uniquement lorsqu'elle se positionne à l'intérieure d'une molécule d'ADN (en s'intercalant entre les bases). En raison du caractère très spécifique de cette intercalation, et du fait que le signal fluorescent produit est directement proportionnel à la quantité d'ADN présent dans le milieu, il est possible de doser de cette manière, de façon très précise, la concentration d'acide nucléique présente dans un échantillon. Le signal est alors exprimé en rfu (relative fluorescent unit).

L'analyse des résultats de PCR sur gel montre la présence d'une seule bande spécifique à la taille attendue dans les échantillons réalisés à partir d'ADN génomique marqué par *para*-Bio-EG3-PDAM. Les bandes ne sont pas détectées lorsque la PCR a été effectuée à partir d'ADN génomique non marqué. Une quantification de l'ADN par Picogreen permet de confirmer la production d'ADN à partir d'ADN génomique capturé sur billes.

Conditions	rfu
Témoins non Marqués	51
ADN marqués	170
Bruit de fond	20

Tableau 34 : Quantification de l'ADN produit par PCR, à partir d'un lysat bactérien, capturé et purifié par le *para*-Bio-EG3-PDAM

Une analyse sur puce à ADN, suivant le protocole décrit à l'exemple 8 permet de confirmer la spécificité de l'amplification comme le montre le tableau 34 ci-dessous.

	Homologie %	I (rfu)	B(rfu)	I/B
Echantillon	98	11531	723	16

Tableau 35 : Détection spécifique de la cible capturée et purifiée par le *para*-Bio-EG3-PDAM

Cet exemple montre qu'il est possible de préparer un échantillon biologique de façon à amplifier l'acide nucléique qu'il contient, en utilisant une technique de capture basée sur la réactivité de la fonction diazométhyle sur les groupements phosphate de celui-ci.

5

**Exemple 47 : Amplification successive de deux gènes à partir d'un ADN bactérien capturé sur un support solide :**

10 Cet exemple montre qu'il est possible d'amplifier à plusieurs reprises et sur des cibles différentes un ADN capturé grâce à la réactivité de la fonction diazométhyle sur les groupements phosphates de celui-ci .

Dans le cas présent, les acides nucléiques, contenus dans un lysat bactérien et marqués par du  
15 *para*-Bio-EG3-PDAM, sont capturés sur des billes magnétiques recouvertes de streptavidine. L'utilisation de billes magnétiques permet de conserver celles-ci par aimantation lors des lavages successifs visant à éliminer les résidus cellulaires présents dans le milieu réactionnel, ces résidus devant être éliminés car ils peuvent inhiber les amplifications par PCR, qui seront pratiquées par la suite. Ces amplifications vont avoir lieu sur deux gènes différents présents  
20 dans l'ADN génomiques, respectivement désignés sous les noms de 16S et *rpoB*. Ces deux gènes sont ensuite analysés par utilisation de puces à ADN.

L'ADN bactérien est obtenu par lyse des cellules contenues dans une culture de  
25 *Mycobacterium tuberculosis*, suivant le protocole déjà décrit dans l'exemple 46. L'ADN bactérien a été quantifié par Picogreen suivant le protocole décrit par le fournisseur, à une concentration de  $10^7$  copies par  $\mu\text{L}$ .

Dix (10)  $\mu\text{L}$  de lysat sont incubés en présence de 20  $\mu\text{L}$  de *para*-Bio-EG3-PDAM durant 30 minutes à 60°C. Parallèlement, 10  $\mu\text{L}$  de lysat sont incubés dans 20  $\mu\text{L}$  d'eau pure (Sigma)  
30 dans les mêmes conditions.

Le milieu réactionnel est ensuite purifié sur colonne QIAquick (Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden, Allemagne). Le protocole de purification utilisé est celui recommandé par le fournisseur. Le volume final d'élution est de 50 µL.

- 5 Les fragments d'ADN marqués sont ensuite capturés sur des billes magnétiques Dynal, qui sont préparées suivant le protocole suivant :

Quatre-vingt-dix (90) µL de billes Dynal sont lavées deux fois par 200 µL d'eau pure Free (Sigma), puis sont reprises par 200 µL de tampon PEG (0,1 M Na PO<sub>4</sub>, pH 7, 0,5 M NaCl ; 0,65 % Tween 20 ; 0,14 mL ADN de sperme de saumon (Gibco) ; 2 % PEG 4000) et incubées  
10 30 min à 37°C. Elles sont ensuite lavées deux fois par 200 µL de tampon PBS 1X Tween 20 0.5%, puis finalement reprises par 90 µL du même tampon.

Dix (10) µL des éluats d'ADN marqués ou non marqués sont incubés 5 min à température ambiante avec 40 µL de tampon PEG et 2,5 µL de la préparation de billes magnétiques décrite  
15 précédemment.

Les billes sont ensuite lavées trois fois par 200 µL de tampon PBS 1 X tween 0,5 %, reprise dans 200 µL d'eau et incubées 20 min à 60°C, puis lavées de nouveau quatre fois par 200 µL de PBS tween. Les billes sont finalement reprises par 25 µL d'eau et une PCR est réalisée en  
20 suivant le protocole décrit dans l'exemple 5.1. Deux contrôles réactionnels sont effectués l'un avec 25 µL d'eau pure (Sigma) et l'autre avec 2,5 µL de billes préparées et lavées dans les même, conditions que les échantillons biologiques, et reprise, dans 25 µL d'eau.

Après amplification, le milieu réactionnel est recueilli, et les billes sont séparées et lavées par  
25 150 µL de PBS 1 X Tween 0,5%, puis resuspendues dans 25 µL d'eau pure (Sigma). Une nouvelle amplification est réalisée sur les billes, mais en présence d'amorces destinées à amplifier le gène rpoB.

Des amplifications témoins réalisés à partir d'ADN génomique non capturé sont réalisées en  
30 parallèle sur les deux systèmes d'amplification (rpoB et 16S).

**Résultat :**

Les produits de PCR obtenus sont ensuite analysés par puces à ADN suivant le protocole décrit à l'exemple 8.

5

Conditions		Homologie (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
PCR témoin 16S	16S	96	4662	387	12
Résultats sur séquence rpoB	RpoB	23	237	358	1
PCR témoin rpoB	RpoB	98	5438	397	14
Résultats sur séquence 16S	16S	17	183	391	1
PCR 16S sur billes	16S	98	2726	534	5
Résultats sur séquence rpoB	RpoB	8	161	480	<1
PCR rpoB sur billes lavées	RpoB	97	3205	349	9
Résultats sur séquence 16S	16S	14	84	358	<1

**Tableau 36 :** Analyse sur puces à ADN des amplicons ADN issus des PCR amplifiées successivement ou non

10 L'analyse des résultats de PCR sur gel montre la présence d'une seule bande spécifique à la taille attendue dans les échantillons réalisés à partir d'ADN génomique marqué par *para*-Bio-EG3-PDAM. Les bandes ne sont pas détectées lorsque la PCR a été effectuée à partir d'ADN génomique non marqué.

15 Une analyse par puce à ADN, telle que présentée sur le tableau 36 ci-dessus, permet de confirmer la spécificité des deux amplifications successives, et donc la capacité de réaliser une amplification successive de plusieurs gènes à partir d'ADN immobilisé sur un support solide, ceci permettant d'éviter la mise au point de systèmes multiplex, qui réduisent souvent de façon importante la sensibilité et l'efficacité des amplifications d'acides nucléiques.

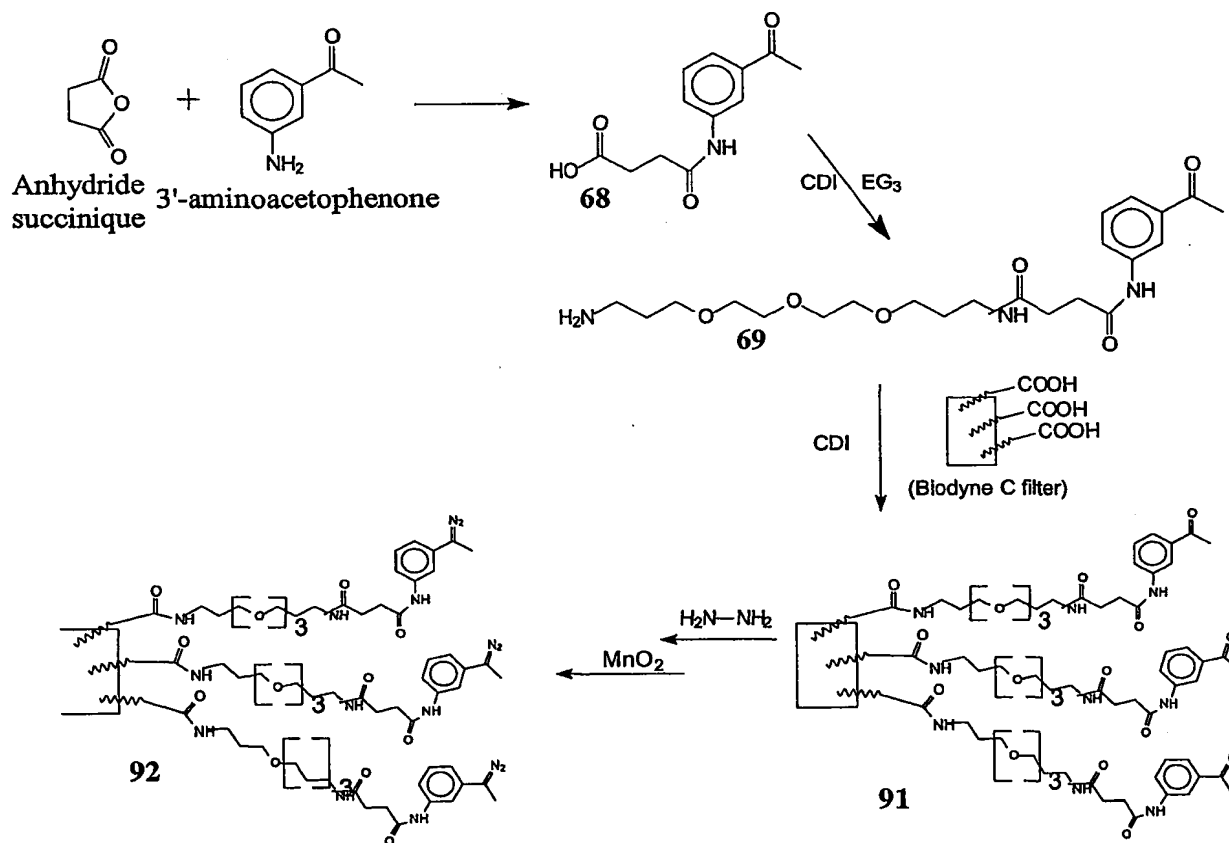
**Exemple 48 : Capture et amplification d'ADN sur une membrane de Nylon portant des groupements diazométhyles :**

Une membrane de nylon activée de façon à porter des groupements diazométhyles a été  
5 utilisée afin de capturer de l'ADN bactérien, dans le but de l'amplifier par PCR.

**Exemple 48.1 : Modification du filtre Biodyne C :**

**Schéma de synthèse :**

10



**Composé 68 :**

On solubilise la 3-aminoacetophenone (14,5 g, 107 mmol) dans 50 ml de DMF anhydre. On ajoute l'anhydride succinique (10,7 g, 107 mmol) et on laisse sous agitation, sous argon et à température ambiante. Après 6 h, la solution est concentrée sous vide et 50 ml de méthanol sont ajoutés. Le précipité obtenu est filtré et lavé avec méthanol et éther. On obtient ainsi 19,4 g (81 %) de produit **68** sous forme d'une poudre de couleur blanc cassé.

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 2,5-2,6 (m, 7H); 7,45 (t, 1H); 7,64 (d, 1H); 7,83 (d, 1H); 8,19 (s, 1H); 10,16 (s, 1H); 12,12 (s, 1H).

10 Composé 69 :

On solubilise 5,07 g (22 mmol) du composé **68** dans 10 ml de DMF anhydre, sous argon. On met sur glace et on ajoute 5,00 g (32 mmol) de carbonyldiimidazole. Après 20 min, on ajoute lentement 20 ml (94,6 mmol) du 4,7,10-trioxatridecanediamine ( $\text{EG}_3$ ). Après 3h de réaction à température ambiante, on évapore le DMF et on reprend le résidu dans 100 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . On fait des extractions avec du  $\text{NaHCO}_3$  saturé et  $\text{H}_2\text{O}$ , après quoi la phase organique est séchée avec du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre et le solvant évaporé. On obtient ainsi 4,34 g (46 %) du produit **69**.

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1,59 (m, 2H); 1,87 (m, 2H); 2,16 (s, 3H); 2,40 (m, 2H); 2,55 (m, 2H); 3,08 (m, 2H); 3,45 (m, 16H); 7,30 (t, 1H); 7,42 (d, 1H); 7,70 (d, 1H); 7,83 (t, 1H); 7,97 (s, 1H); 10,00 (s, 1H).

Composé 91 :

25 Un rectangle de 4  $\text{cm}^2$  est découpé sur une feuille de filtre Biodyne C (référence 60314 ; Pall Gelman Laboratory ; Ann Arbor ; Michigan ; USA), introduit dans un flacon et mis en contact avec 0,97 g (6 mmol) de carbonyldiimidazole (CDI) dans 3 ml de DMF anhydre, sur glace, sous argon et sous forte agitation. Après 20 min, la solution est éliminée et le filtre lavé avec du DMF. Une quantité de 0,53 g du produit **68** (1 mmol) dans 3 ml de DMF anhydre est  
30 ensuite ajoutée, et la réaction se réalise pendant la nuit à température ambiante. La solution est ensuite enlevée et le filtre est rincé avec de l'éthanol, séché sous vide et gardé sous argon.

**Composé 92 :**

Le filtre modifié 91 est mis dans une solution de 97 ml d'hydrazine hydrate (2 mmol) dans 4  
5 ml d'éthanol absolu. La solution est mise à reflux pendant 5 h. Après avoir laissé refroidir, le  
filtre est lavé avec H<sub>2</sub>O, éthanol et éther, séché sous vide et mis sous argon. Ensuite, on ajoute  
4 ml de DMF anhydre et 86 mg de MnO<sub>2</sub> (1 mmol), et on laisse réagir sous forte agitation.  
Après 20 min, la solution est rejetée, et le filtre est rincé avec du DMF et de l'éther. Le filtre  
modifié-diazométhyl 92 est conservé sous argon, à une température de -19 à -31°C.

10

**Exemple 48.2 : Essais biologiques :**

La membrane activée est découpée en petits fragments de 2 mm<sup>2</sup> qui vont être incubés  
pendant 30 minutes à température ambiante dans 25 µl de lysat bactérien de *Mycobacterium*  
15 *tuberculosis*, préparé par lyse mécanique suivant la même technique et la même concentration  
finale que dans l'exemple 46, et 375 µl d'eau pure (Sigma).

20

La membrane est ensuite placée à 65°C pendant 60 min dans 100 mL de tampon de lavage (5  
% Formamide (Sigma), 1X SSPE (Perbio), 0.01 % triton X-100) afin d'éliminer les acides  
nucléiques non spécifiques adsorbés sur la membrane, puis celle-ci est stockée dans 1 mL  
d'eau pure avant amplification.

25

La PCR est pratiquée comme décrite dans le paragraphe 5.1, le volume réactionnel étant  
complété par une quantité suffisante d'eau pure.

Parallèlement, des contrôles sont effectués suivant le même processus avec des membranes ne  
pouvant pas lier de façon covalente les acides nucléiques :

- Membrane Biodyne C non modifiée (membrane A),
- Membrane Biodyne modifiée chimiquement suivant le processus décrit, mais non traitée  
30 par du DMF anhydre et du MnO<sub>2</sub> ; ce contrôle permet de vérifier le comportement de la  
membrane en l'absence de groupements diazométhyles (membrane B), et

- Membrane Biodyne C non modifiée, mais traitée 20 min sous forte agitation par du DMF anhydre et du  $\text{MnO}_2$ , ce contrôle permettant de vérifier que cette dernière étape ne modifie pas l'adsorption de l'ADN sur la membrane (membrane C).

5 Afin de contrôler l'absence d'inhibition de la PCR provoquée par le traitement des membranes, un autre fragment des membranes A, B, C est amplifié simultanément avec 25  $\mu\text{l}$  de lysat bactériens.(tubes A', B', C')

10 Les produits de PCR sont ensuite quantifiés par Picogreen suivant le protocole décrit par le fournisseur.

Résultat :

Tests effectués	Signal (rfu)
Membrane modifiée	111
Membrane non modifiée (A)	18
Membrane non modifiée, co-amplifiée avec 25 $\mu\text{L}$ de lysat bactérien (A')	260
Membrane modifiée non activée (B)	26
Membrane modifiée non activée, co-amplifiée avec 25 $\mu\text{L}$ de lysat bactérien (B')	264
Membrane non modifiée ayant subi une activation (C)	21
Membrane non modifiée ayant subi une activation, co-amplifiée avec 25 $\mu\text{L}$ de lysat bactérien (C')	268

15 Tableau 37 : Quantification de l'ADN obtenu par PCR à partir d'ADN de lysat bactérien  
capturé sur support solide

Ces résultats du tableau 37 indiquent qu'il est possible de capturer de façon covalente sur un support solide, des acides nucléiques, issus de lysat, grâce à la chimie diazométhyle.

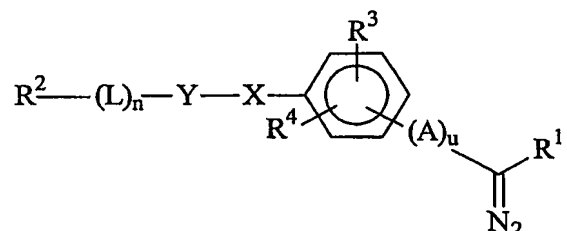
20 L'amplification observée n'est pas due à une adsorption non spécifique de l'ADN sur la membrane. D'autre part, on observe avec les contrôles effectués avec les PCR que les membranes ne provoquent pas d'inhibition de la réaction d'amplification.



Afin de contrôler la nature du produit amplifié sur la membrane, le produit d'amplification a été analysé par passage sur puce à ADN, suivant le protocole décrit auparavant.

# REVENDECATIONS

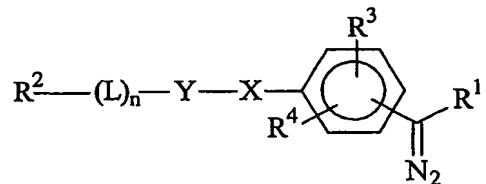
1. Réactif de marquage stable à la température de formule (0) :



5 dans laquelle :

- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^2-(L)_n-Y-X-$ , OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u est un nombre entier compris entre 0 et 2, préférentiellement de 0 ou 1, et
- $-Y-X-$  représente  $-\text{CONH}-$ ,  $-\text{NHCO}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ .

2. Réactif de marquage, selon la revendication 1, de formule (1) :

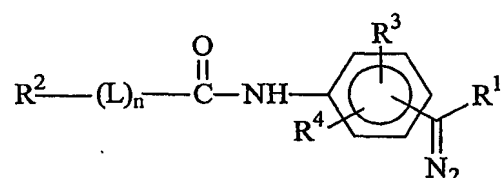


20 dans laquelle :

- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,

- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
  - $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^2$   $-(L)_n$ -Y-X-, OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle, et
- 5 • -Y-X- représente  $-\text{CONH}-$ ,  $-\text{NHCO}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ .

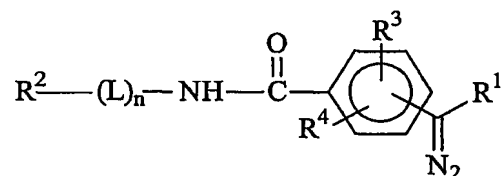
3. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, de formule (2) :



dans laquelle :

- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
  - $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
  - L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1, et
- 15 •  $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^2$   $-(L)_n$ -Y-X-, OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle.

4. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, de formule (3) :

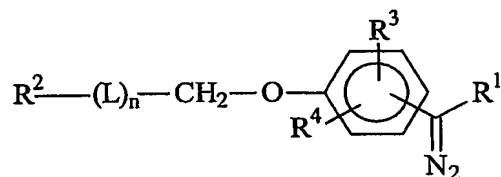


20 dans laquelle :

- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
  - $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
  - L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1, et
- 25

- $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^2-(L)_n-Y-X-$ , OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle.

5. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, de formule (4) :



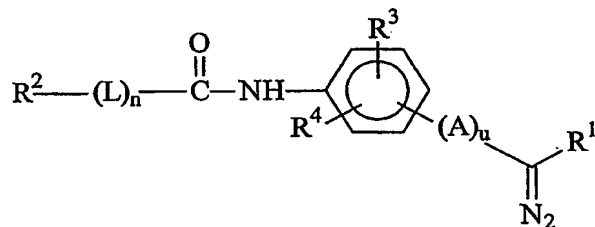
5

dans laquelle :

- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- 10 • L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1, et
- $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^2-(L)_n-Y-X-$ , OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle.

15

6. Réactif, selon la revendication 1, de formule (21) :

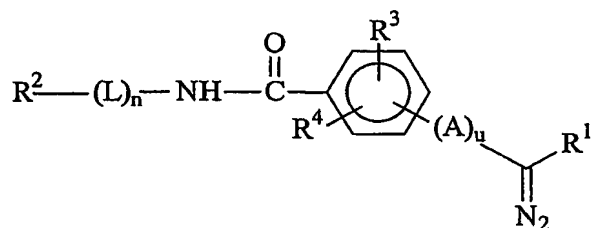


dans laquelle :

- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- 20 • L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u égal 1, et

- $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^2-(L)_n-Y-X-$ , OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle.

7. Réactif, selon la revendication 1, de formule (22) :

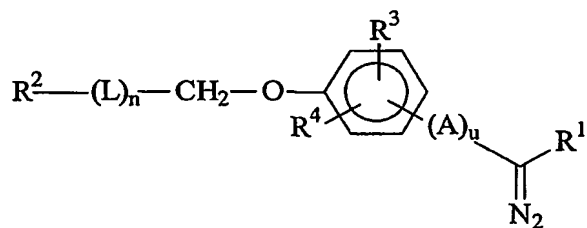


5

dans laquelle :

- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- 10 • L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u égal 1, et
- $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^2-(L)_n-Y-X-$ ,
- 15 OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle.

8. Réactif, selon la revendication 1, de formule (23) :



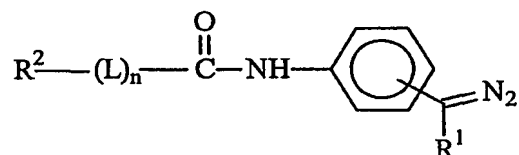
dans laquelle :

- 20 •  $R^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,

- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u égal 1, et
- 5 •  $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^2-(L)_n-Y-X-$ , OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle.

9. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé par le fait que  $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{OCH}_3$ ,  $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ ,  $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ .

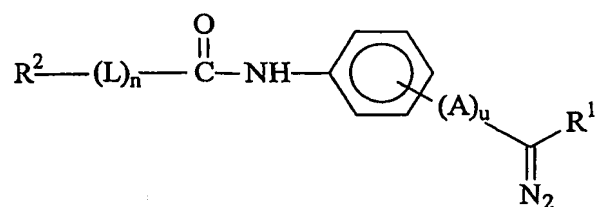
10. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, de formule (2') :



15 dans laquelle :

- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique, et
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1.

11. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 6, de formule (24) :



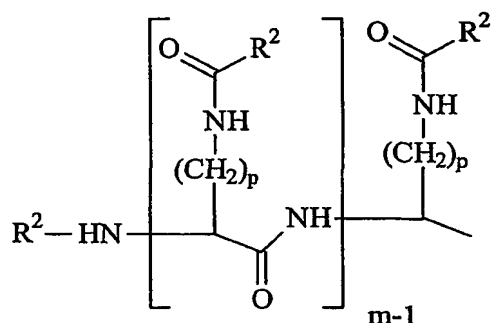
dans laquelle :

- 25 •  $R^1$  représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,

- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique, et
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u égal 1.

5

12. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans laquelle la structure  $R^2-(L)_n-$  est de formule (5) :

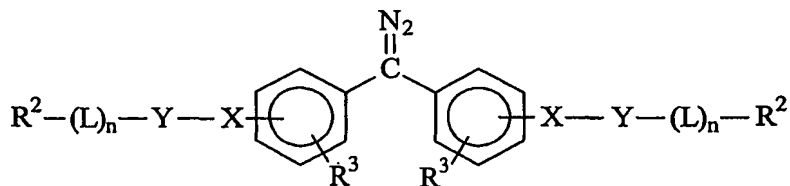


10 dans laquelle :

- $R^2$  représente un marqueur détectable,
- m est un nombre entier compris entre 1 et 100, et
- p est un nombre entier compris entre 1 et 10.

15

13. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, de formule (6) :



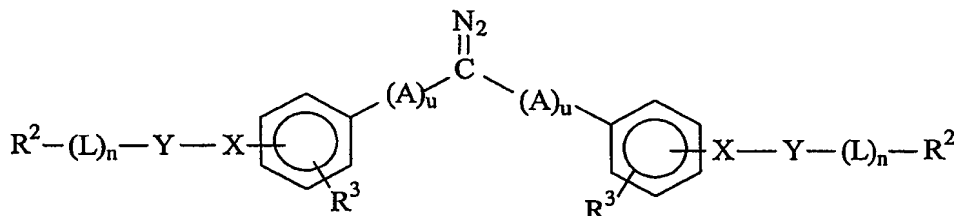
dans laquelle :

- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- $R^3$  représente H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^2-(L)_n-Y-X-$ , OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle,

20

- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1, et
- -Y-X- représente -CONH-, -NHCO-, -CH<sub>2</sub>O-, -CH<sub>2</sub>S-.

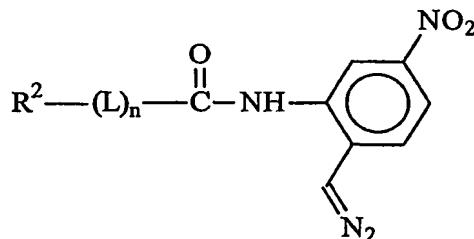
5 14. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, de formule (25) :



dans laquelle :

- R<sup>2</sup> représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- 10 • R<sup>3</sup> représente H, NO<sub>2</sub>, Cl, Br, F, I, R<sup>2</sup> -(L)<sub>n</sub>-Y-X-, OR, SR, NR<sub>2</sub>, R, NHCOR, CONHR, COOR avec R = alkyle ou aryle,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u égal 1, et
- 15 • -Y-X- représente -CONH-, -NHCO-, -CH<sub>2</sub>O-, -CH<sub>2</sub>S-.

15. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, de formule (14) :



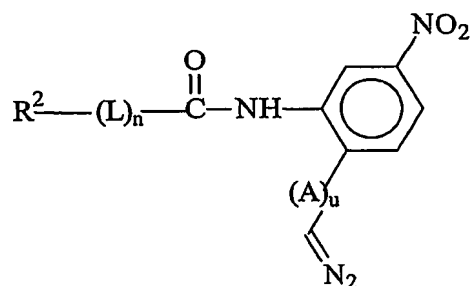
20 dans laquelle :

- R<sup>2</sup> représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique, et



- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1.

16. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 6, de formule (26) :



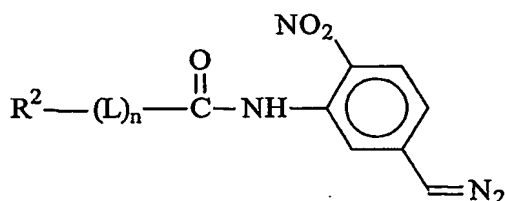
5

dans laquelle :

- $\text{R}^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u égal 1, et
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1.

10

17. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, de formule (15) :



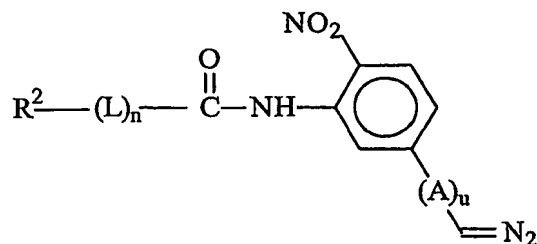
15

dans laquelle :

- $\text{R}^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique, et
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1.

20

18. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 6, de formule (27) :



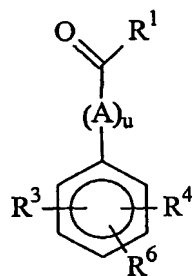
dans laquelle :

- $R^2$  représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- 5 • A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u égal 1, et
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1.

- 10 19. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisé par le fait que L comprend un motif  $-(O-CH_2-CH_2)-$ , répété de 1 à 20 fois, préférentiellement de 1 à 10 fois, et encore plus préférentiellement de 2 à 5 fois.

- 15 20. Procédé de synthèse d'un réactif de marquage, selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un dérivé de formule (16 bis) :



dans laquelle :

- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle ou aryle ou aryle substitué,
- 20 •  $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $NO_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^6$ , OR, SR,  $NR_2$ , R,  $NHCOR$ ,  $CONHR$ ,  $COOR$  avec R = alkyle ou aryle,
- $R^6$  représente  $COOH$ ,  $COOM$ ,  $NH_2$ , OH ou SH avec M = alkyle, en particulier méthyle ou

éthyle, et

- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazométhyle avec le cycle aromatique et u est un nombre entier égal à 0 ou 1,

5           b) on dispose d'un marqueur ou d'un précurseur de marqueur possédant une fonction réactive  $R^7$  complémentaire de  $R^6$ ,

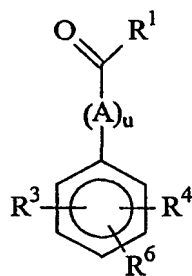
          c) on fait réagir ensemble la fonction complémentaire dudit marqueur ou précurseur de marqueur avec la fonction  $R^6$  du dérivé de formule (16 bis) en présence d'au moins un agent de couplage pour former une liaison covalente,

10          d) on fait réagir l'hydrazine ou un de ses dérivés sur la fonction cétone ou aldéhyde pour former une hydrazone, et

          e) on transforme l'hydrazone en fonction diazométhyle à l'aide d'un traitement approprié.

15          21. Procédé de synthèse d'un réactif de marquage, selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, comprenant les étapes suivantes :

          a) on dispose d'un dérivé de formule (16 bis) :



dans laquelle :

- 20    •  $R^1$  représente H ou un groupe alkyle ou aryle ou aryle substitué,
- $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $NO_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^6$ , OR, SR,  $NR_2$ , R,  $NHCOR$ ,  $CONHR$ ,  $COOR$  avec R est alkyle ou aryle,
- $R^6$  représente  $COOH$ ,  $COOM$ ,  $NH_2$ , OH ou SH avec M est alkyle, en particulier méthyle ou éthyle, et
- 25    • A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazométhyle avec le cycle aromatique et u est un nombre entier

égal à 0 ou 1,

b) on dispose d'un bras de liaison L possédant au moins deux fonctions réactives  $R^8$  identiques ou différentes, la première fonction  $R^8$  complémentaire de  $R^6$  et la deuxième fonction  $R^8$  complémentaire de  $R^7$  et on dispose en outre d'un marqueur ou d'un précurseur de marqueur possédant une fonction réactive  $R^7$ ,

c) on fait réagir la première fonction réactive  $R^8$  du bras de liaison L avec le dérivé de formule (16 bis), en présence d'au moins un agent de couplage, pour former une liaison covalente, puis on fait réagir la deuxième fonction réactive  $R^8$  du bras de liaison L avec le marqueur ou le précurseur de marqueur, en présence d'au moins un agent de couplage pour former une liaison covalente,

d) on fait réagir l'hydrazine ou un de ses dérivés sur la fonction cétone ou aldéhyde pour former une hydrazone, et

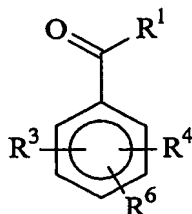
e) on transforme l'hydrazone en fonction diazométhyle à l'aide d'un traitement approprié.

22. Procédé de synthèse, selon l'une quelconque des revendications 20 ou 21, caractérisé par le fait qu'il comprend :

- une étape supplémentaire de protection de la fonction cétone ou aldéhyde du composé (16 bis), et
- une étape supplémentaire ultérieure de déprotection de ladite fonction cétone ou aldéhyde

23. Procédé de synthèse, selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer les étapes suivantes :

a) on dispose d'un dérivé de formule (16) :



dans laquelle :

- $R^1$  représente H ou un groupe alkyle ou aryle ou aryle substitué,

- $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^6$ , OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle, et
- $R^6$  représente  $\text{COOH}$ ,  $\text{NH}_2$ , OH ou SH.

b) on dispose d'un marqueur ou d'un précurseur de marqueur possédant une fonction réactive  $R^7$  complémentaire de  $R^6$ ,

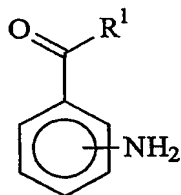
c) on fait réagir ensemble la fonction complémentaire dudit marqueur ou précurseur de marqueur avec la fonction  $R^6$  du dérivé de formule (16) en présence d'au moins un agent de couplage pour former une liaison covalente,

d) on fait réagir l'hydrazine ou un de ses dérivés sur la fonction cétone ou aldéhyde pour former une hydrazone, et

e) on transforme l'hydrazone en fonction diazométhyle à l'aide d'un traitement approprié.

24. Procédé de synthèse d'un réactif de marquage, selon la revendication 10, comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un dérivé de formule (17):



dans laquelle  $R^1$  représente H ou un groupe alkyle ou aryle ou aryle substitué,

b) on dispose d'un marqueur ou d'un précurseur de marqueur possédant une fonction acide carboxylique,

c) on fait réagir ensemble la fonction carboxylique dudit marqueur ou précurseur de marqueur et la fonction amine primaire du dérivé de formule (17) en présence d'au moins un agent de couplage pour former une liaison amide,

d) on fait réagir de l'hydrazine sur la fonction cétone ou aldéhyde provenant du dérivé de formule (17) pour former une hydrazone, et

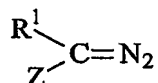
e) on oxyde ladite hydrazone en présence de  $\text{MnO}_2$  pour former une fonction diazométhyle.

25. Procédé pour le marquage d'une molécule biologique, en particulier un acide nucléique, comprenant la mise en contact en solution homogène, dans un tampon sensiblement aqueux, d'une molécule biologique et d'un réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 19.

5

26. Molécule biologique marquée susceptible d'être obtenue par le procédé, selon la revendication 25.

27. Procédé de marquage et de fragmentation d'un acide nucléique simple ou double  
brin comprenant les étapes suivantes :  
- fragmenter l'acide nucléique,  
- attacher un marqueur sur au moins un des fragments par l'intermédiaire d'un réactif de marquage choisi parmi les composés de formule (19):



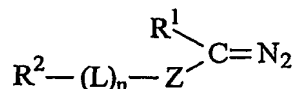
15 dans laquelle :

- R<sup>1</sup> représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué, et
- Z comprend un marqueur détectable,

ledit réactif se couplant de manière covalente et majoritaire sur au moins un phosphate dudit fragment.

20

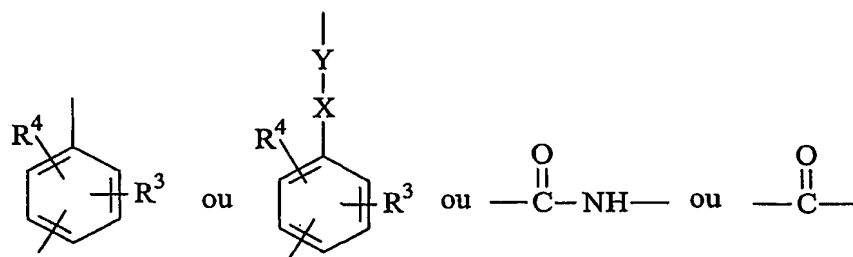
28. Procédé, selon la revendication 27, caractérisé par le fait que le réactif de marquage est choisi parmi les composés de formule (20) :



dans laquelle :

- 25
- R<sup>1</sup> représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
  - R<sup>2</sup> est un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,

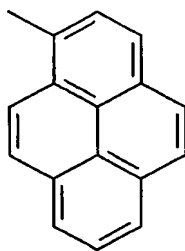
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n est égal à 0 ou 1, et
- Z est choisi parmi :



dans lequel :

- $R^3$  et  $R^4$  représentent indépendamment l'un de l'autre : H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R^2$  -  $(\text{L})_n$ -Y-X-, OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$ ,  $\text{COOR}$  avec R = alkyle ou aryle, et
  - -Y-X- représente -CONH-, -NHCO-,  $-\text{CH}_2\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ .
- 10

29. Procédé, selon la revendication 27, caractérisé par le fait que Z est :



30. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 27 à 29, caractérisé par le fait que la fragmentation et le marquage sont effectués en deux étapes.

31. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 27 à 29, caractérisé par le fait que la fragmentation et le marquage sont effectués en une étape.

20

32. Procédé, selon l'un quelconque des revendications 27 à 31, caractérisé par le fait que le marquage s'effectue en solution homogène sensiblement aqueuse.

33. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 27 à 32, caractérisé par le fait que la fragmentation s'effectue par voie enzymatique, physique ou chimique.

34. Acide nucléique marqué susceptible d'être obtenu par le procédé, selon l'une quelconque des revendications 27 à 33.

35. Kit de détection d'un acide nucléique cible comprenant un acide nucléique marqué, selon la revendication 34.

36. Support solide sur lequel est fixé un réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 19.

37. Procédé de capture d'acides nucléiques comprenant les étapes suivantes :

- on dispose d'un support solide sur lequel est fixé directement ou indirectement au moins une molécule comprenant une fonction diazométhyle,
- on met en contact un échantillon biologique susceptible de contenir des acides nucléiques libres, et
- on lave le support solide où la (ou les) molécule(s) sont fixée(s) de manière covalente au moins à un acide nucléique.



Fig. 1

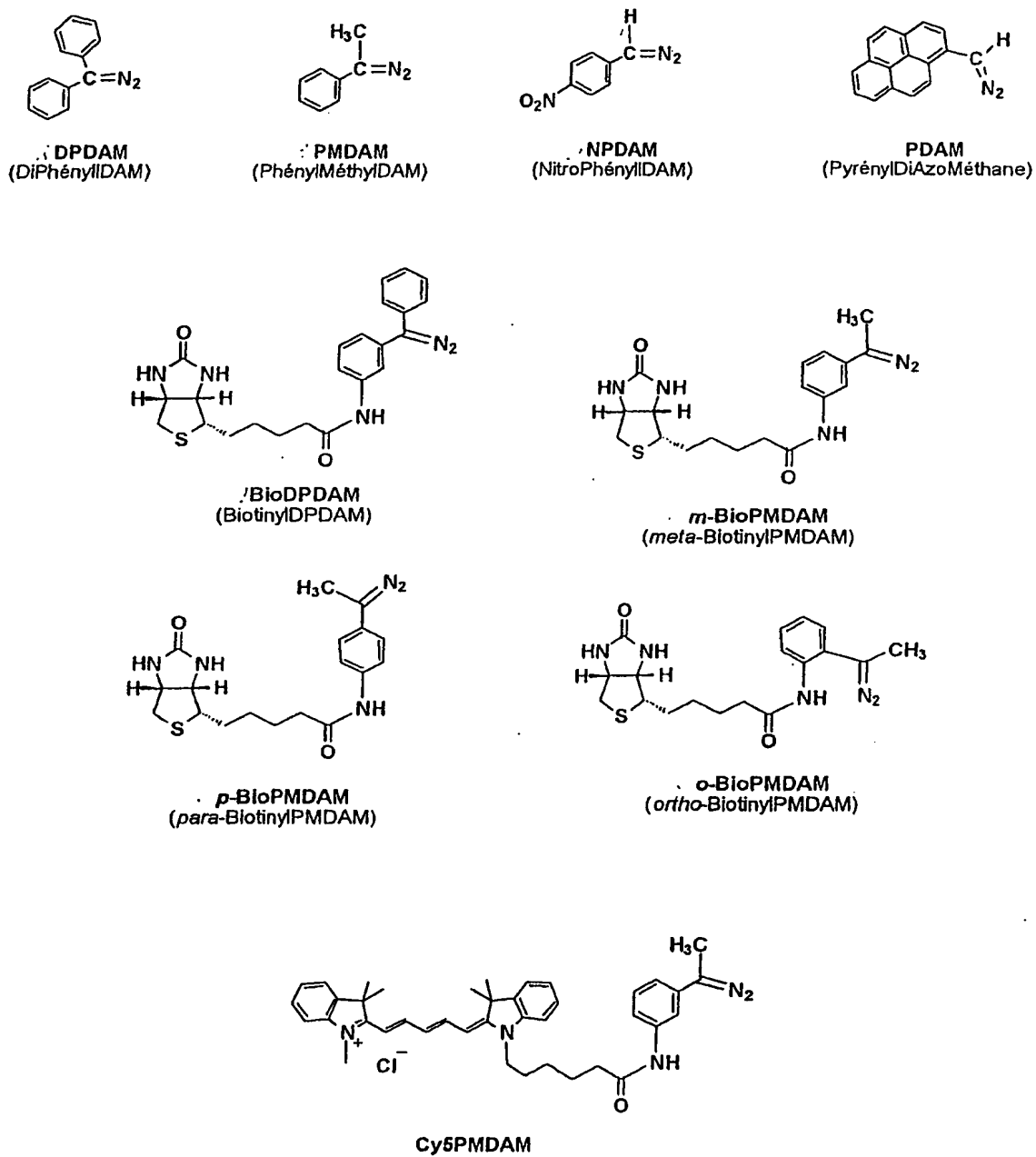


Fig. 2A

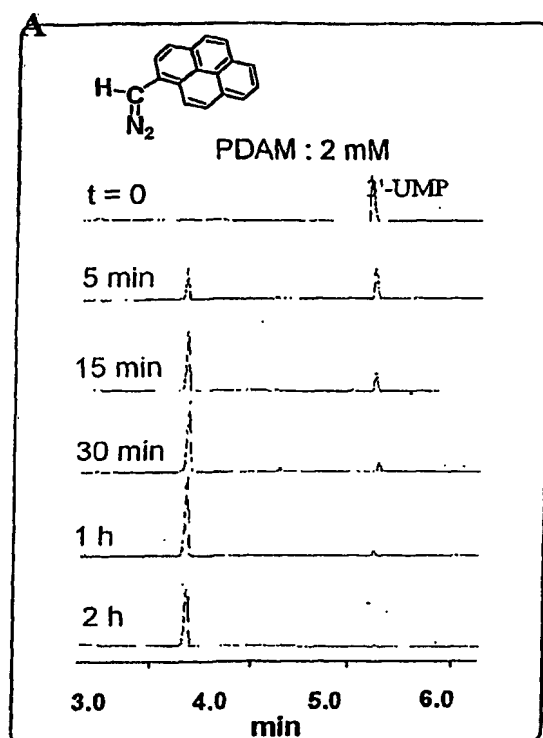


Fig. 2B

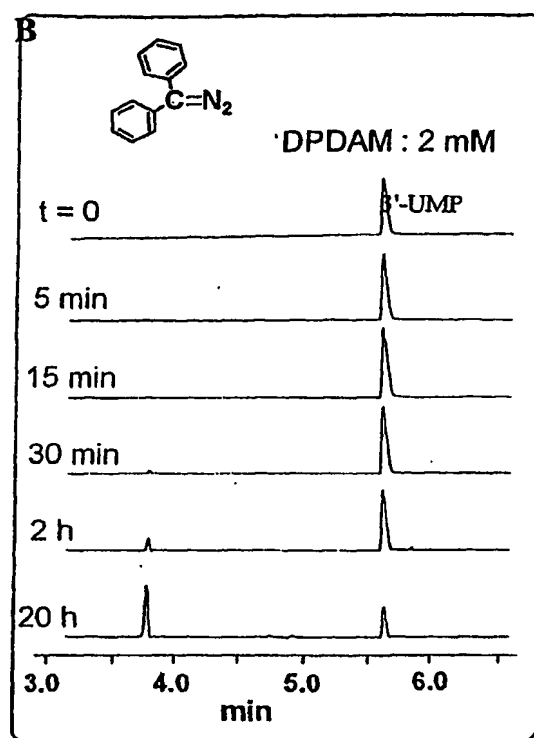


Fig. 2C

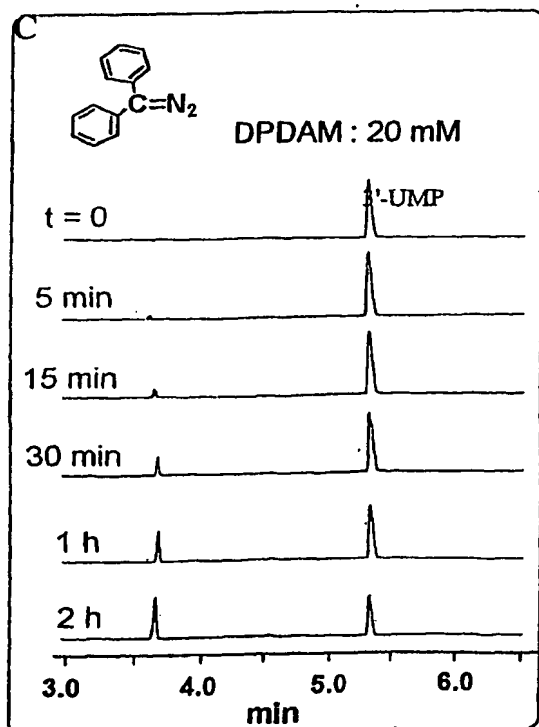


Fig. 2D

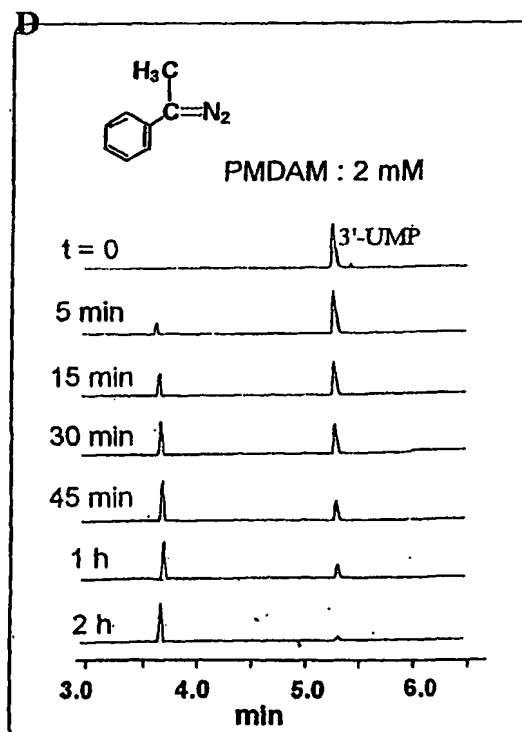


Fig. 2E

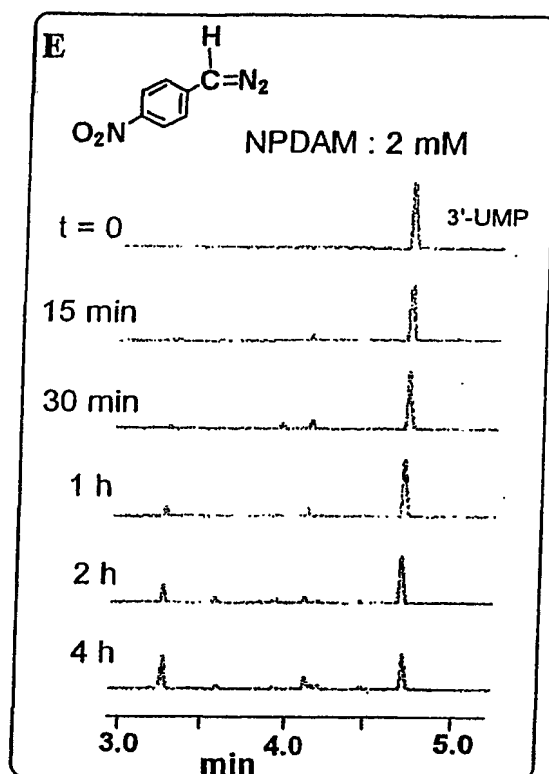


Fig. 2F

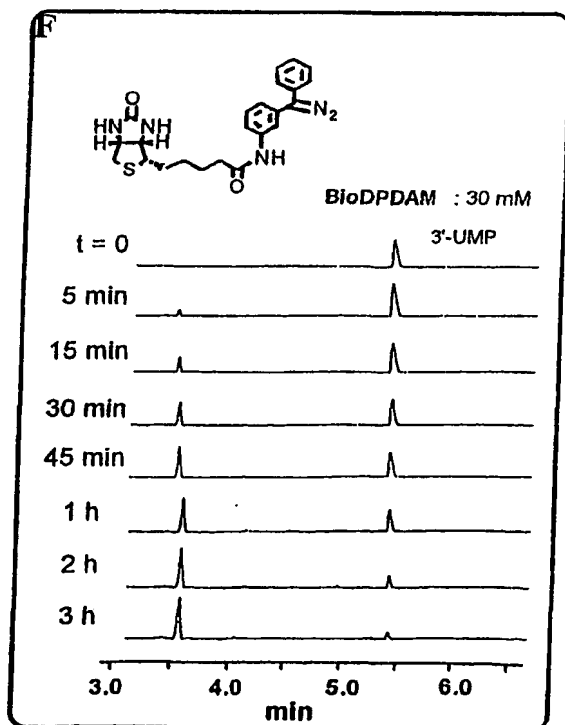


Fig. 2G

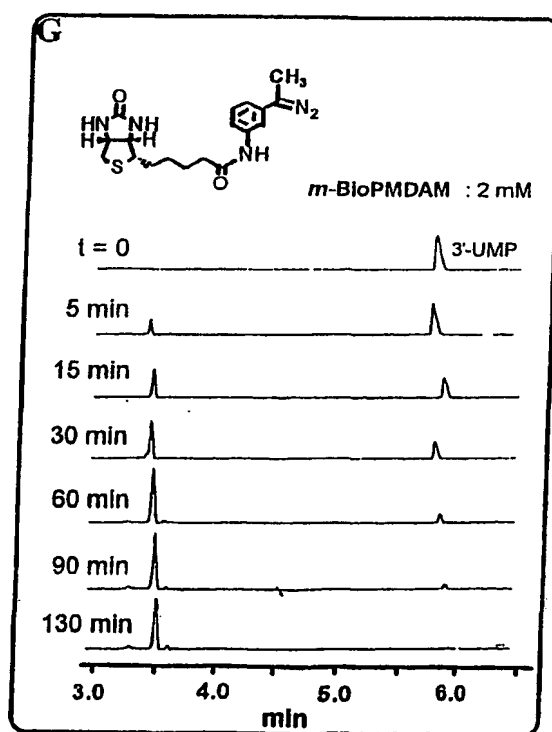


Fig. 2H

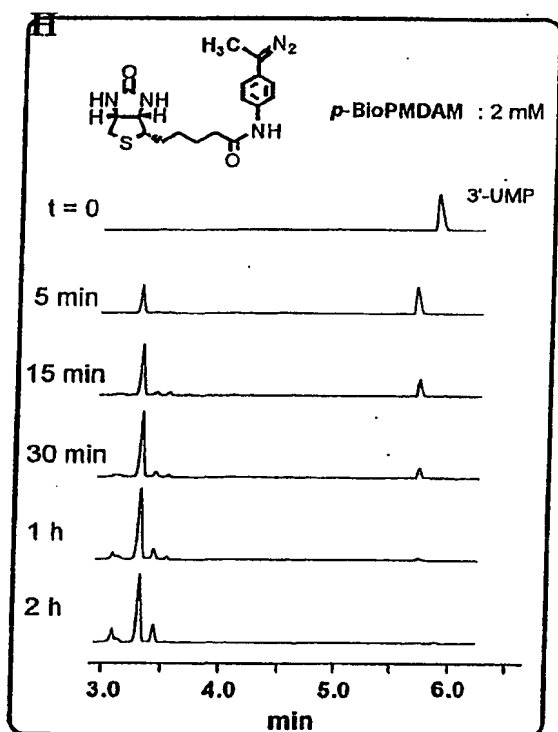


Fig. 2I

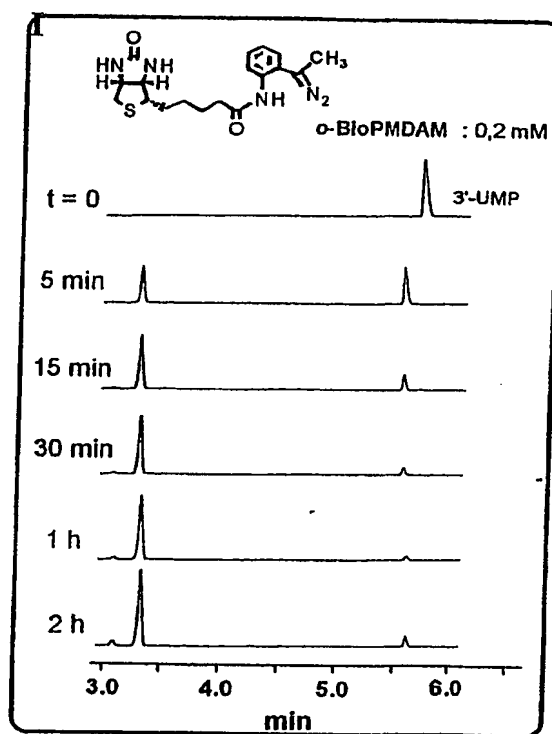


Fig. 3A

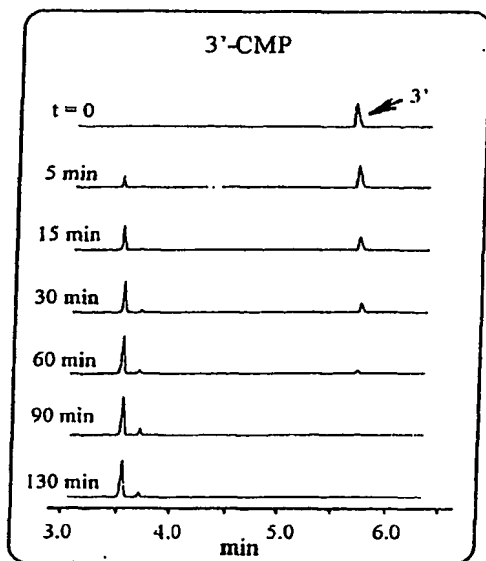


Fig. 3B

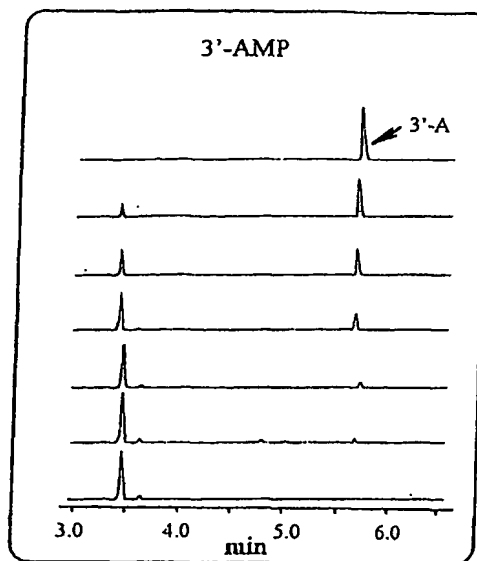


Fig. 3C

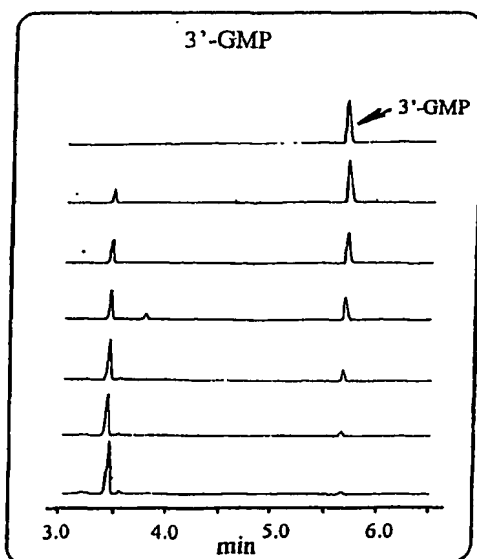


Fig. 3D

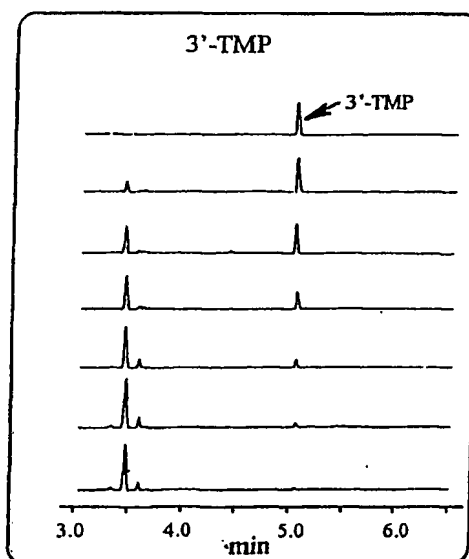


Fig. 4

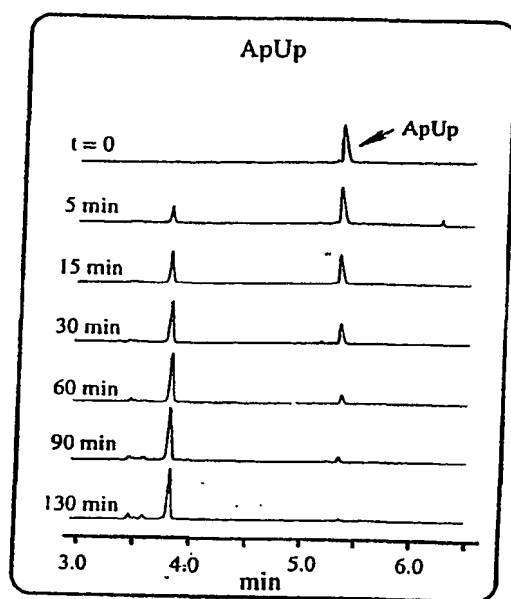


Fig. 5A

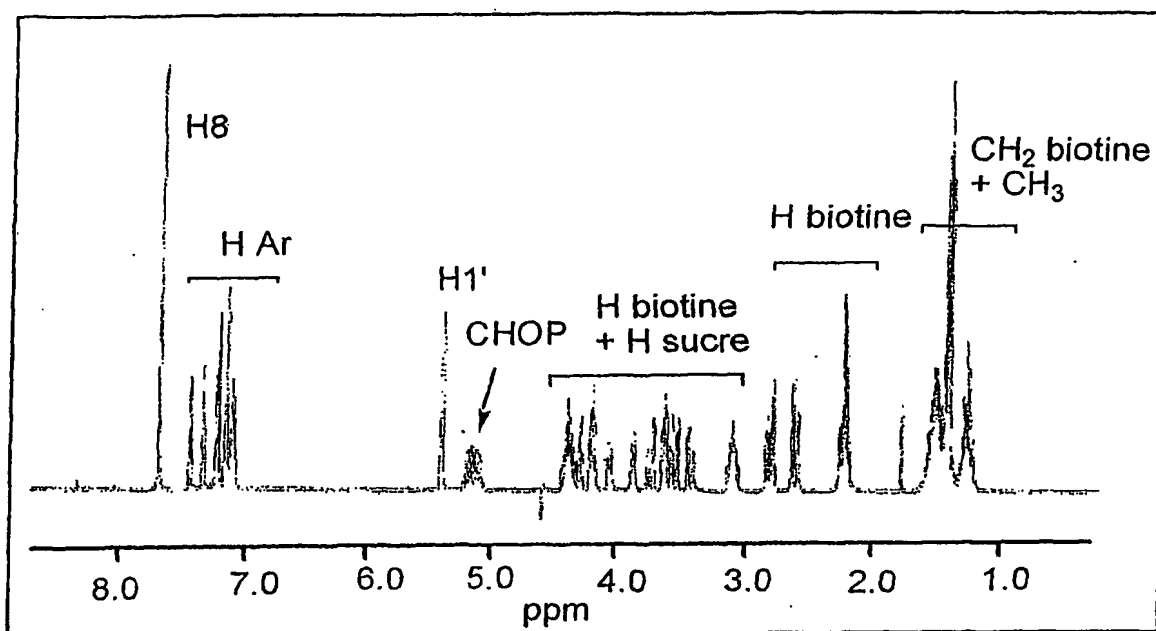


Fig. 5B

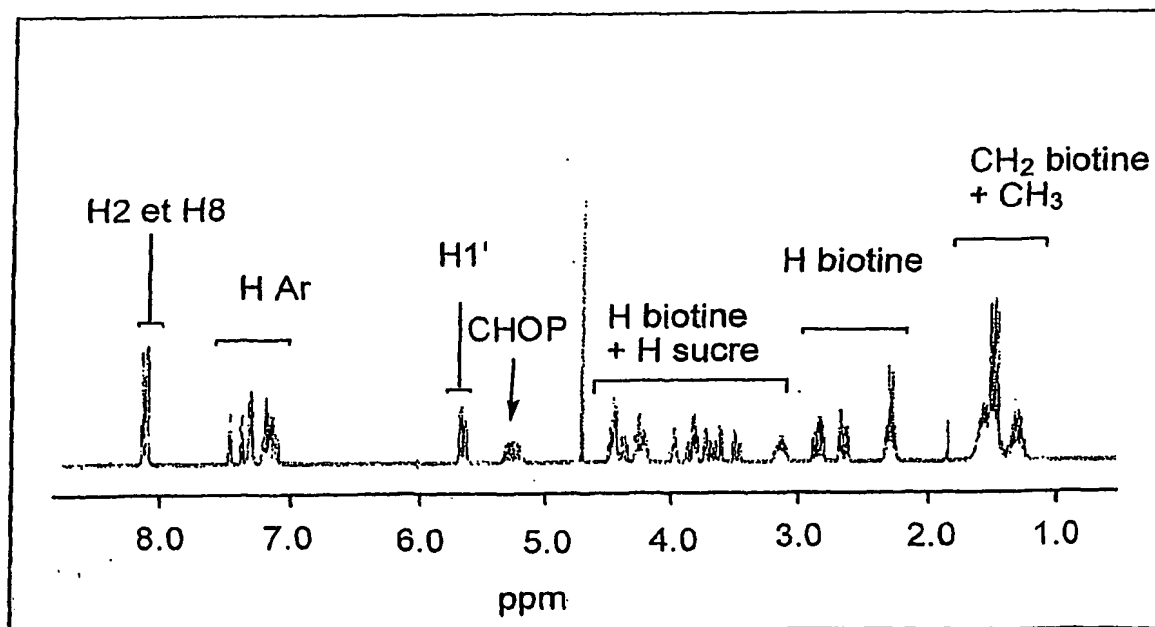


Fig. 5C

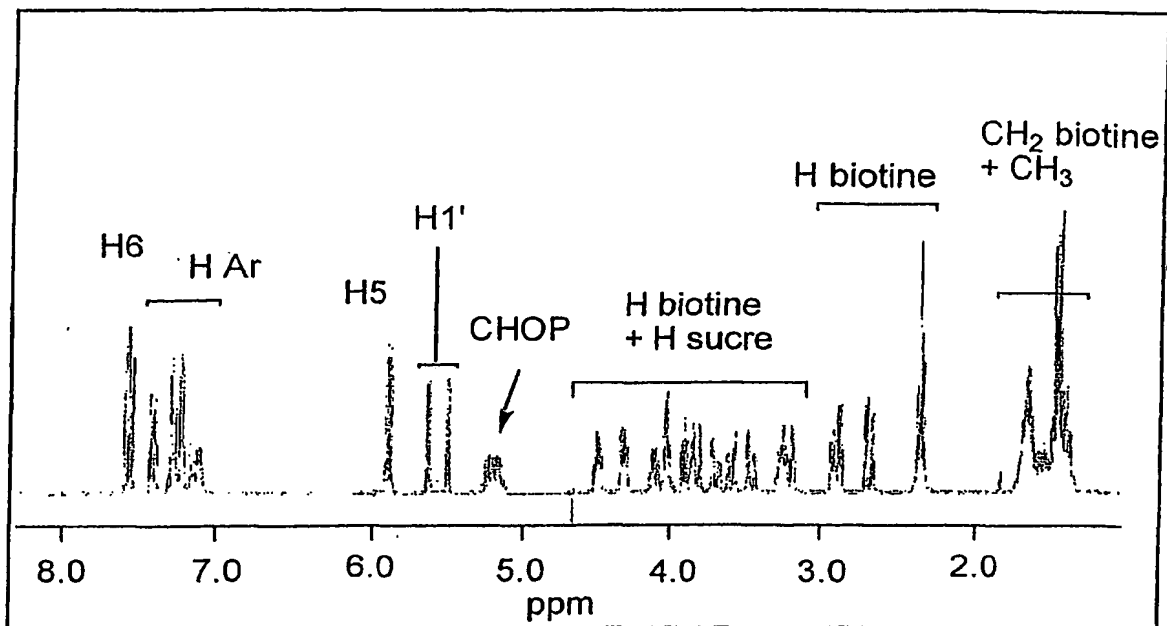


Fig. 5D

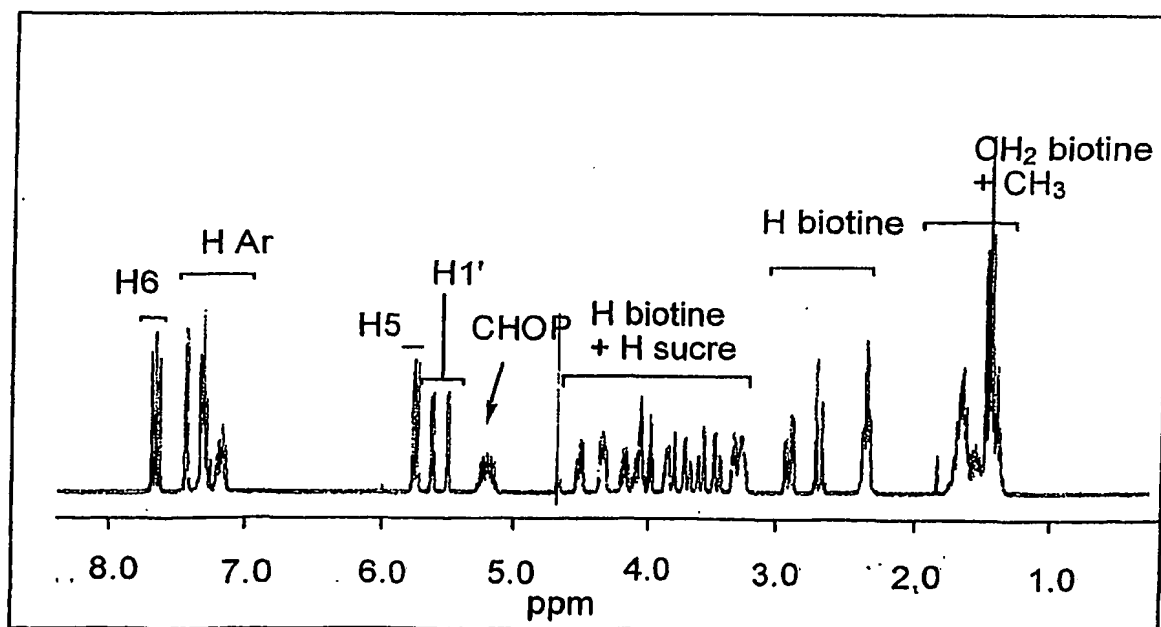




Fig. 6

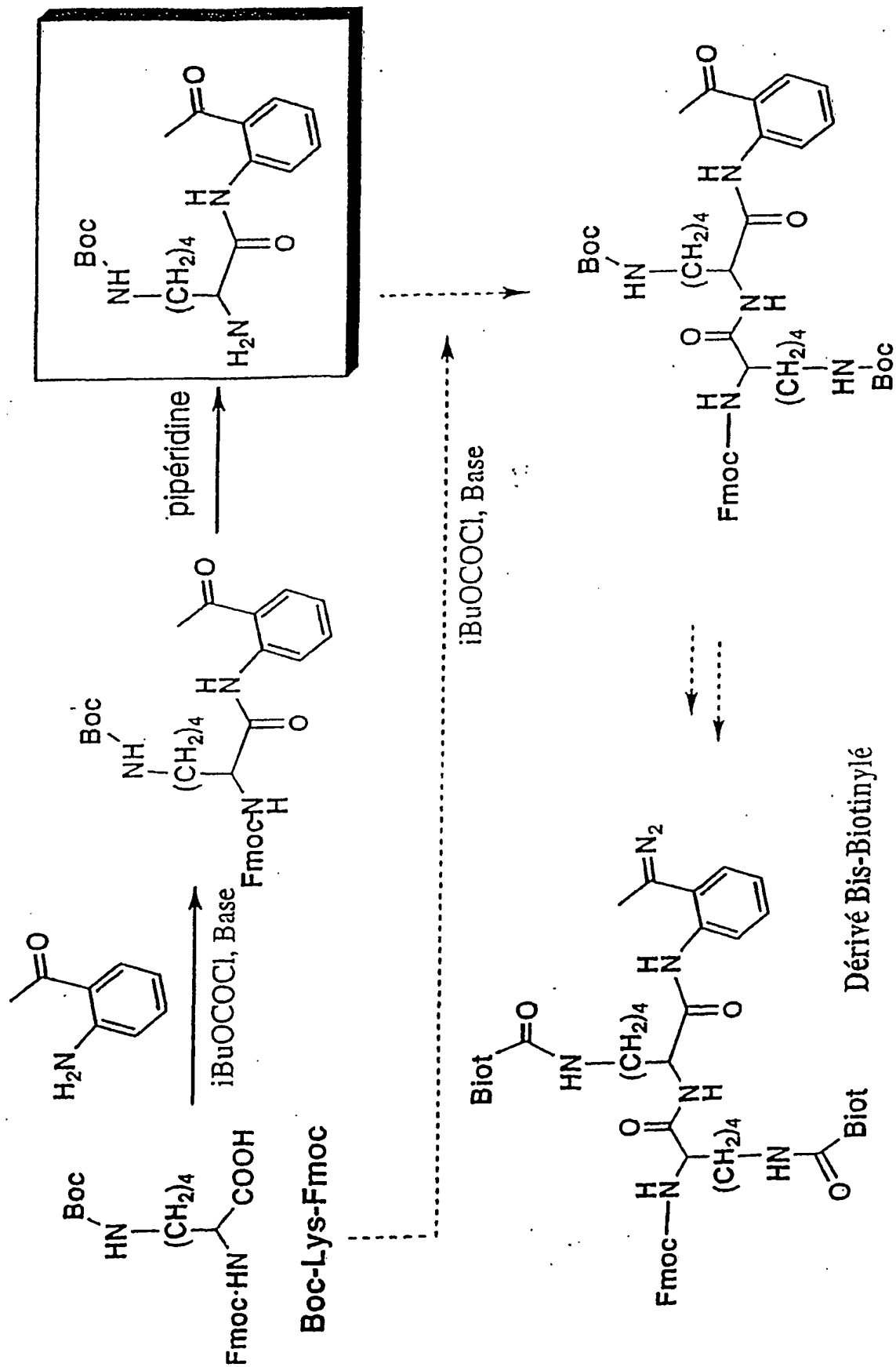


Fig 7

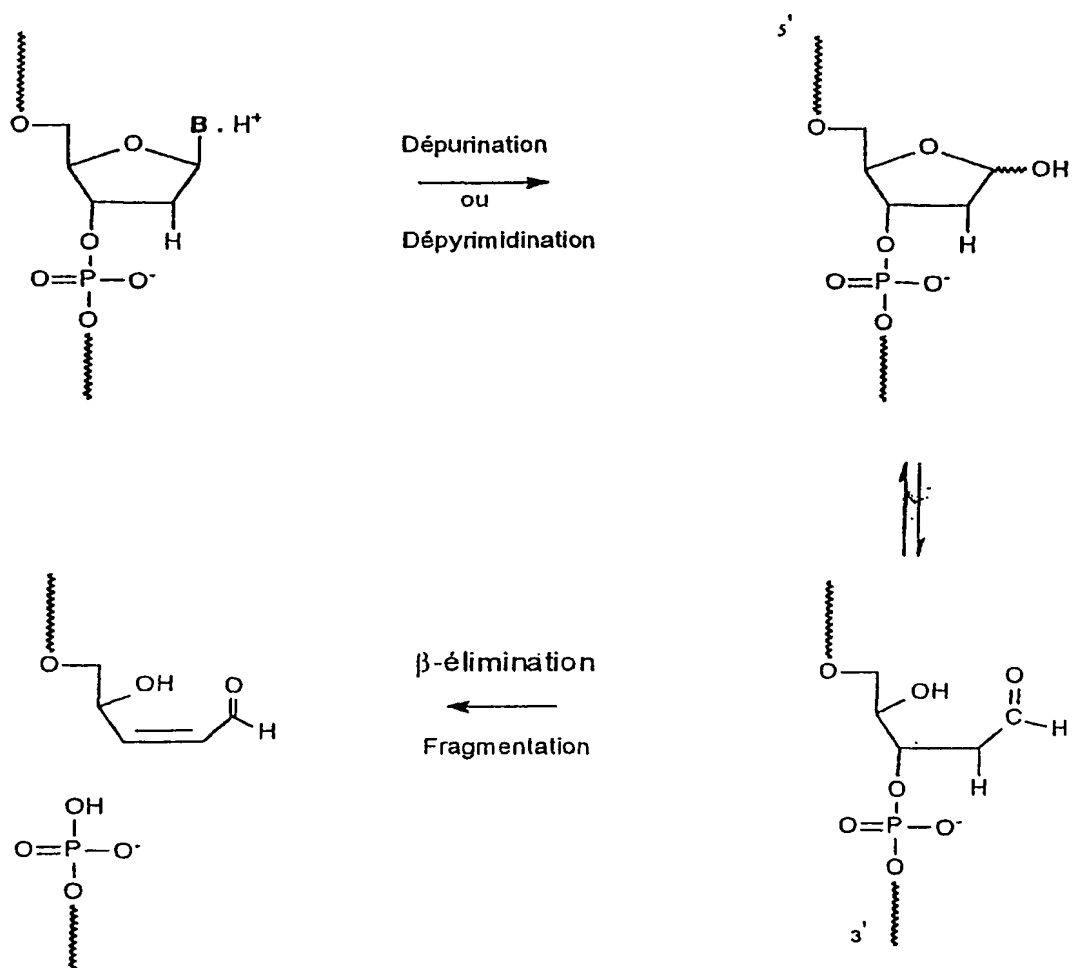


Fig 8

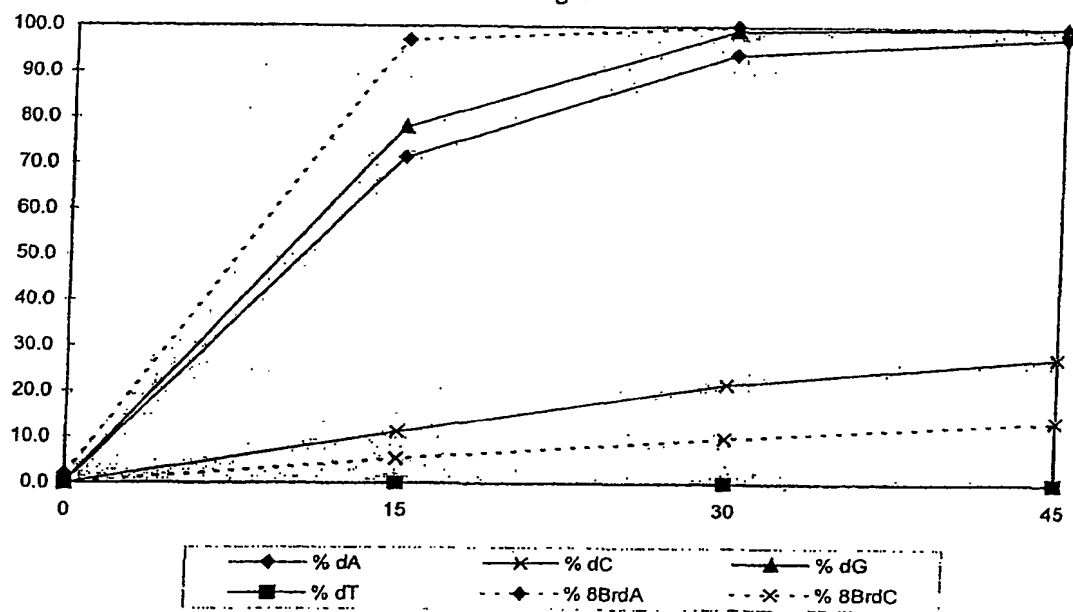


Fig 9

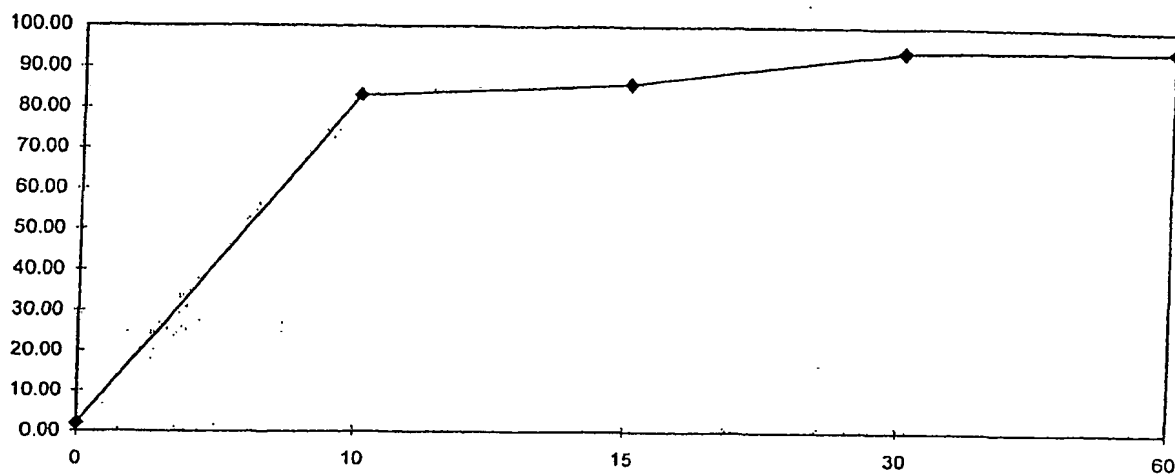


Fig 10

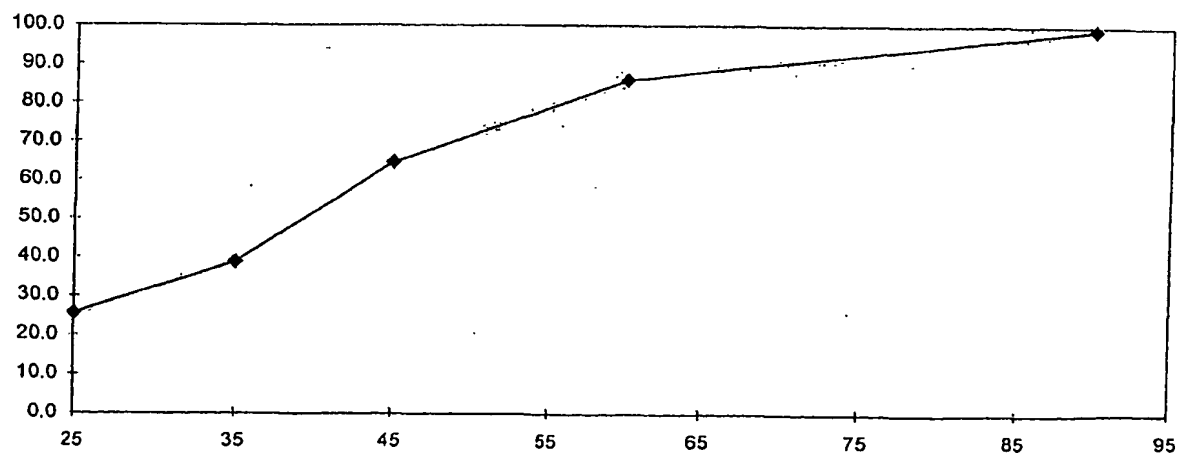
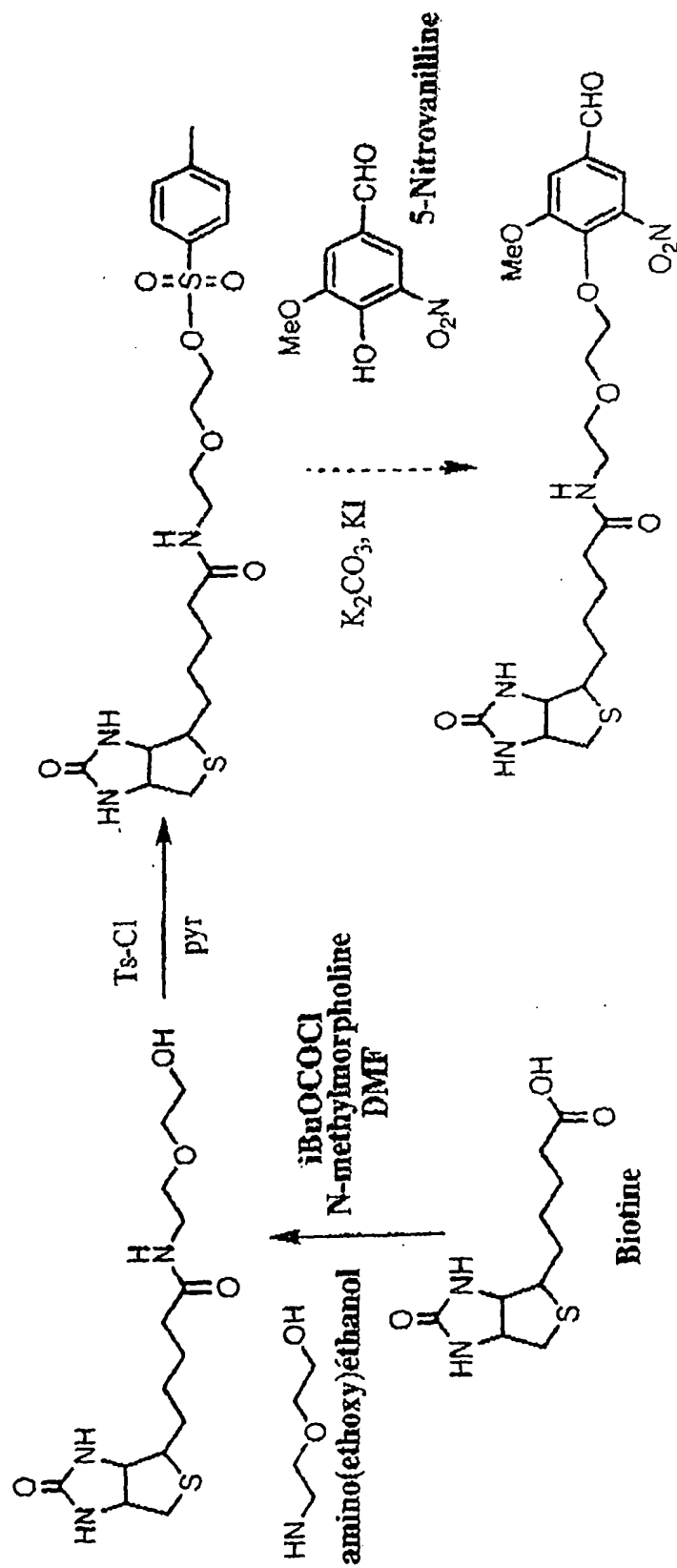


Fig 11



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/01543

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07C245/14 C07C245/18 C07D209/14 C07D495/04 C07D311/82  
C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07C C07D C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MASANOBU SHIGA ET AL.: "Fluorescence Detection of DNA Using A Novel Peroxidase Substrate, 4-(4-Hydroxyphenylcarbamoyl)butanoic Acid" ANALYTICAL SCIENCES, vol. 11, no. 4, 1995, pages 591-595, XP008005960 Tokyo, Japan the whole document	1-12, 20-28, 30-37
X	MASANOBU SHIGA ET AL.: "Synthesis of a Novel Biotin Derivative That Bears a Diazo Group as the Reactive Site" ANALYTICAL SCIENCES, vol. 9, no. 4, 1993, pages 553-556, XP008005959 Tokyo, Japan the whole document	1-12, 20-28, 30-37

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 July 2002

Date of mailing of the international search report

25/07/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zervas, B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/01543

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 65926 A (BIO MERIEUX) 23 December 1999 (1999-12-23) claims; figures; examples ---	1, 25-27, 34-37
A	MAKRIGIORGOS G M ET AL: "FLUORESCENT LABELLING OF ABASIC SITES: A NOVEL METHODOLOGY TO DETECT CLOSELY-SPACED DAMAGE SITES IN DNA" INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY, TAYLOR AND FRANCIS, LONDON, GB, vol. 74, no. 1, 1998, pages 99-109, XP002925462 ISSN: 0955-3002 page 99 -page 102; figure 3 ---	1, 25-27, 34-37
A	WO 90 08838 A (RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGIES) 9 August 1990 (1990-08-09) claims; examples -----	1, 25-27, 34-37

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 02/01543

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9965926	A	23-12-1999	FR	2780059 A1		24-12-1999
			AU	4269299 A		05-01-2000
			CN	1310722 T		29-08-2001
			EP	1087983 A1		04-04-2001
			WO	9965926 A1		23-12-1999
			US	6376179 B1		23-04-2002
WO 9008838	A	09-08-1990	CA	2007431 A1		10-07-1990
			WO	9008838 A1		09-08-1990



## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 02/01543

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07C245/14 C07C245/18 C07D209/14 C07D495/04 C07D311/82  
C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07C C07D C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MASANOBU SHIGA ET AL.: "Fluorescence Detection of DNA Using A Novel Peroxidase Substrate, 4-(4-Hydroxyphenylcarbamoyl)butanoic Acid" ANALYTICAL SCIENCES, vol. 11, no. 4, 1995, pages 591-595, XP008005960 Tokyo, Japan le document en entier	1-12, 20-28, 30-37
X	MASANOBU SHIGA ET AL.: "Synthesis of a Novel Biotin Derivative That Bears a Diazo Group as the Reactive Site" ANALYTICAL SCIENCES, vol. 9, no. 4, 1993, pages 553-556, XP008005959 Tokyo, Japan le document en entier	1-12, 20-28, 30-37
	--- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 juillet 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/07/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Zervas, B

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 02/01543

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 99 65926 A (BIO MERIEUX) 23 décembre 1999 (1999-12-23) revendications; figures; exemples -----	1,25-27, 34-37
A	MAKRIGIORGOS G M ET AL: "FLUORESCENT LABELLING OF ABASIC SITES: A NOVEL METHODOLOGY TO DETECT CLOSELY-SPACED DAMAGE SITES IN DNA" INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY, TAYLOR AND FRANCIS, LONDON, GB, vol. 74, no. 1, 1998, pages 99-109, XP002925462 ISSN: 0955-3002 page 99 -page 102; figure 3 -----	1,25-27, 34-37
A	WO 90 08838 A (RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGIES) 9 août 1990 (1990-08-09) revendications; exemples -----	1,25-27, 34-37

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 02/01543

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9965926	A	23-12-1999	FR 2780059 A1	24-12-1999
			AU 4269299 A	05-01-2000
			CN 1310722 T	29-08-2001
			EP 1087983 A1	04-04-2001
			WO 9965926 A1	23-12-1999
			US 6376179 B1	23-04-2002
WO 9008838	A	09-08-1990	CA 2007431 A1	10-07-1990
			WO 9008838 A1	09-08-1990

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**